

最終報告書

表 題 : N,N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドのラットにおける
2 世代繁殖毒性試験
試験番号 : S R 0 5 2 4 1

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙	1
目次	6
表題、試験番号	13
要約	15
緒言	17
材料および方法	17
成績	35
考察	44
参考文献	48
 Figures	 50
1 Outline of the two-generation reproductive toxicity study in rats with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	 51
2 Body weights of F0 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	 52
3 Body weights of F1 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	 53
4 Body weights of F0 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	 54
5 Body weights of F1 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	 55

6 Food consumption of F0 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	56
7 Food consumption of F1 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	57
8 Food consumption of F0 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	58
9 Food consumption of F1 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	59
10 Body weights of F1 rat pups in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	60
11 Body weights of F2 rat pups in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)	61
Tables	62
1 General appearance in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	65
2 General appearance in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	66
3 Body weights of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	67
4 Body weights of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	68
5 Body weight gains of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	69
6 Body weight gains of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	70

7	Food consumption of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	71
8	Food consumption of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	72
9	Test substance intake of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	73
10	Test substance intake of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	74
11	Vaginal estrous cycles in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	75
12	Reproductive findings in F0 and F1 parental rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	76
13	Sperm number and motility in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	77
14	Abnormal sperm ratio in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	78
15	Sexual development in F1 parental rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2- benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	79
16	Locomotor activity count in F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	80
17	Locomotor activity count in F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	81
18	Data on learning tests in F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	82

19	Data on learning tests in F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	83
20	Hematological findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	84
21	Hematological findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	85
22	Blood chemical findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	86
23	Blood chemical findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	87
24	Serum hormone levels in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	88
25	Serum hormone levels in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	89
26	Autopsy findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	90
27	Autopsy findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	91
28	Absolute and relative organ weights in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	92
29	Absolute and relative organ weights in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	94
30	Histopathological findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	96

31	Histopathological findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	98
32	Number of primordial follicles in F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	99
33	General appearance in F1 and F2 male rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	100
34	General appearance in F1 and F2 female rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	104
35	Body weights of F1 and F2 rat pups treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	108
36	Anogenital distance of F1 and F2 rat pups on postnatal day 4 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	109
37	Physical development in F1 and F2 rat pups treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	110
38	Reflex response tests in F1 and F2 rat pups treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	111
39	Autopsy findings in F1 and F2 male rat pups euthanized on postnatal day 4 or found dead on postnatal days 0-4 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	112
40	Autopsy findings in F1 and F2 female rat pups euthanized on postnatal day 4 or found dead on postnatal days 0-4 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	113
41	Autopsy findings in F1 and F2 male rat weanlings euthanized on postnatal day 26 or animals found dead on postnatal days 5-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	114

42	Autopsy findings in F1 and F2 female rat weanlings euthanized on postnatal day 26 or animals found dead on postnatal days 5-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	115
43	Absolute and relative organ weights in F1 and F2 male rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	116
44	Absolute and relative organ weights in F1 and F2 female rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	118
45	Histopathological findings in F1 and F2 rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)	120

表題：N,N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドのラットにおける2世代繁殖毒性試験

試験番号：S R 0 5 2 4 1

試験目的：この試験は、N,N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドのラットの繁殖能力に及ぼす影響の有無を2世代にわたって評価するために行われた。

要 約

N,N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド (DCBS) を 0、80、600 および 4500 ppm (F0 雄 ; 0、5.2、39、291 mg/kg/day : F0 雌 ; 0、7.2、54、416 mg/kg/day : F1 雄 ; 0、5.9、44、331 mg/kg/day : F1 雌 ; 0、7.4、55、417 mg/kg/day 相当) の濃度で基礎飼料に混合して、1 群当たり雌雄各 24 匹の Cr1:CD(SD) ラットに 2 世代にわたって摂取させ、親動物の繁殖能力と児動物の発生・発育に及ぼす影響を検討した。

親動物に対する被験物質投与の一般毒性的影響については、80 ppm 群では一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、自発運動量、水迷路試験、血液学的検査、血液化学的検査、ホルモンレベル、剖検および器官重量のいずれの検査項目においても認められなかった。

600 ppm 群では、水迷路試験において F1 雌の T 型水迷路 1 日目の目標地点への到達時間に有意な高値がみられた以外に変化はみられなかった。

4500 ppm 群では、いずれの世代においても一般状態に DCBS 投与に関連する変化はみられなかったが、体重および体重増加量に F0 世代において雄では投与期間を通じて、雌では投与開始直後および妊娠期間中または哺育期間中に有意な低値がみられた。一方、雌の哺育 0-21 日の体重増加量に有意な高値がみられた。F1 世代では雌雄とも有意な差はみられなかった。摂餌量については雄の F0 世代ではほぼ投与期間を通じて、F1 世代で投与第 4 週に、雌の F0 世代で投与第 1 週および哺育 14-21 日に有意な低値がみられた。器官重量では肝臓の絶対重量に F1 雌雄で、相対重量に F0 雄および F1 雌雄で、副腎の絶対および相対重量に雌の両世代で、腎臓の相対重量に F0 および F1 雌雄で有意な高値または高値傾向がみられたが、これらの器官の病理組織学的検査では変化はみられなかった。F1 雌の原始卵胞数には対照群との間に有意差はみられなかった。また、水迷路試験において F1 雌の T 型水迷路 1 日目の目標地点への到達時間および過誤回数の有意な高値がみられた。

親動物の繁殖能力に対する影響は、80 ppm 群では認められなかった。600 および 4500 ppm 群では、F1 雌の膈開口の分化完了の有意な遅延および完了日の体重の有意な増加がみられ、離乳児の子宮重量に有意な低値がみられたことから抗エストロゲン作用の可能性が示唆された。F1 雄では、4500 ppm 群で包皮分離の分化完了に有意な遅延がみられたが、完了日の体重に有意な差は認められなかった。しかし、親動物の繁殖成績、ホルモンレベルあるいは雌雄の生殖器官の重量には影響はみられなかった。また、精子検査で 4500 ppm 群の F1 雄の精子頭部の振幅に有意な低値がみられたが、他の指標に変化はみられなかった。

児動物に対する被験物質投与の影響は、80 ppm 群では一般状態、生存率、産児数、性比、肛門生殖突起間距離、体重、発育分化、反射反応性検査、剖検および器官重量のいずれの検査項目においても認められなかった。

600 ppm 群では、肝臓の相対重量に F1 雄および F2 雄雌で有意な高値、子宮の絶対および相対重量に F2 雌で有意な低値がみられた。

4500 ppm 群では、F1 雌雄の生後 4 日以降、F2 雄の生後 7、14 および 21 日、F2 雌の生後 14 および 21 日の体重ならびに F1 および F2 雌雄の剖検日（生後 26 日）の体重に有意な低値がみられた。切歯萌出の平均完成日齢に F2 雌雄で有意な高値が認められた。離乳児の器官重量については、肝臓の相対重量に F1 および F2 雌雄で有意な高値、胸腺および脾臓の絶対および相対重量に F1 および F2 雌雄で有意な低値または低値傾向が見られたが、これらの器官の病理組織学的検査では変化はみられなかった。また、子宮の絶対または相対重量に F1 および F2 雌で有意な低値がみられた。

以上の結果から、DCBS 投与の F0 および F1 親動物に対する一般毒性的影響に関して、600 ppm 以上の用量で F1 雌の水迷路試験における影響、4500 ppm で雌雄の体重の増加抑制および摂餌量の抑制、雌雄の肝臓および腎臓重量ならびに雌の副腎重量の高値がみられた。繁殖能力については、600 ppm 以上の用量で F1 雌、4500 ppm の F1 雄の性成熟を遅らせたが、成熟後の繁殖能力には 4500 ppm の用量まで影響を及ぼさなかった。一方、F1 および F2 児動物に対しては、600 ppm 以上の用量で雌雄の肝臓重量の高値および雌の子宮重量の低値、加えて 4500 ppm では哺育期間中の児動物の体重増加抑制ならびに胸腺および脾臓重量の低値がみられた。

したがって、DCBS を 2 世代にわたってラットに投与した場合、親動物に対する一般毒性的影響に関しての無毒性量、親動物の繁殖能力に対する無毒性量および児動物に対する無毒性量はいずれも 80 ppm (5.2 mg/kg/day 相当) であると結論される。

緒 言

N,N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドは、ゴム製品を生産する過程で加硫促進剤として添加される有機ゴム薬品の一つで、国内で製造されている¹⁾。OECDテストガイドライン 301C試験により、100 mg/Lの本物質は、28 日間で 2%分解されるとの報告がある²⁾。環境省の環境調査³⁾では水質あるいは底質に本物質は検出されていない。

ほ乳動物毒性データでは、LD₅₀ はマウスで 8500 mg/kg⁴⁾、ラットの雄で 1821 mg/kg、雌で 1077 mg/kg⁵⁾と報告されている。反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験⁶⁾では、本物質を 0、6、25、100 および 400 mg/kg/day の用量で、1 群当たり雌雄各 10 匹のSD系ラットに、交配開始 14 日前から、雄は 44 日間、雌は分娩後哺育 3 日（40～51 日間）まで強制経口投与した。その結果、100 mg/kg 以上の群で自発運動の低下および被毛汚染、400 mg/kg 群で流涎がみられた。さらに雄では 100 mg/kg 以上の群で腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の出現、400 mg/kg 群で体重増加抑制および摂餌量低値、雌では 100 mg/kg以上の群で腎臓の近位尿細管上皮の脂肪変性、400 mg/kg 群で体重および摂餌量の低値、副腎皮質細胞の空胞化、脾臓および胸腺の萎縮がみられた。繁殖への影響として、黄体数、着床数および出産児数の減少、分娩遅延、分娩時の母動物の死亡、ならびに新生児の死亡がみられた。4 週間反復経口投与毒性試験⁷⁾では、被験物質を 2000、3000、5000、7500 および 10000 ppm（約 133、200、333、500 および 666 mg/kg/day相当）の濃度で混合した飼料を、1 群当たり雌雄各 5 匹のSD系ラットに 4 週間摂取させた。その結果、10000 ppm 群では体重増加抑制および摂餌量低値がみられた。しかし、器官重量または病理組織学的変化は観察されなかったと報告されている。

この試験の目的は、N,N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドの親動物の繁殖能力および兒動物の発生・発育に及ぼす影響の有無を検討することであり、被験物質を 0、80、600 および 4500 ppm の濃度で基礎飼料に混合して 1 群当たり雌雄各 24 匹の Cr1:CD(SD) ラットに 2 世代にわたって摂取させた。

材料および方法

1. 被験物質

試験用として被験物質（Appendix 1）7 kg（ロット番号 ）を 2005 年 11 月 21 日に から入手し、2006 年 4 月 17 日から 2007 年 2 月 7 日まで使用した。被験物質は遮光気密容器に入れて冷蔵（実測範囲 1～8℃、受入から最終使用日まで）で株式会社化合物安全性研究所の検体保存室に保存した。被験物質を取り扱う際は、手袋およびマスク等を着用した。

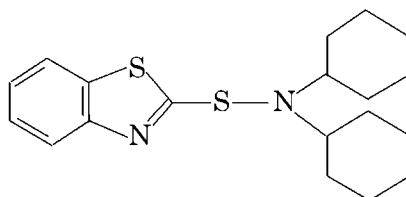
被験物質の性質は以下の通りである。

物質名 : N,N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド

化学名 : N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide

略号（コード名） : DCBS

化学構造式 :



分子式 : $C_{19}H_{26}N_2S_2$

分子量 : 346.55

CAS 番号 : 4979-32-2

物理化学的性質 : 外観 ; 灰白色細粒

溶解性 ; 水 ; 難溶 (0.003 g/100 mL, 24.5°C)

メタノール ; わずかに溶解 (0.76 g/100 mL, 21.3°C)

アセトン ; 溶解 (5.30 g/100 mL, 24.5°C)

トルエン ; 易溶 (38.89 g/100 mL, 18.5°C)

純度 : 99.7%

被験物質サンプルとして、上記ロットについて約 1 g を採取し、株式会社化合物安全性研究所の資料保存室に保存した。

投与期間終了後、残余被験物質の一部を提供者に送付して純度の分析を実施し、被験物質の投与期間中の安定性を確認した (Appendix 2)。ただし、この分析は非 G L P で行われた。なお、残余被験物質は関連試験の操作終了後廃棄する。

2. 被験物質混合飼料の調製および化学分析

(1) 調製方法、調製頻度および保存方法

用量群毎に所定量の被験物質を基礎飼料の一部と混合し、次に所定の濃度になるよう基礎飼料を加え混合機で攪拌した。被験物質を取り扱う際は、手袋およびマスク等を着用した。調製は 4 日から 20 日の間隔で実施し、調製した飼料は動物に給与するまでの間、株式会社化合物安全性研究所の検体保存室に室温（実測範囲 20～25°C）で保存した。

被験物質混合飼料は、安定性の保証されている調製後 21 日以内に使用し、残余調製飼料は焼却処分するために産業廃棄物として回収した。

(2) 調製飼料の均一性、安定性および濃度分析

投与に先行して、低用量および高用量の調製飼料について均一性および安定性を確認した。

均一性については調製直後に混合機の上層、中層および下層からそれぞれ試料を採取して、被験物質の濃度を分析した。分析の結果、変動係数が低用量および高用量でそれぞれ 2.2%および 1.2%であり被験物質は調製飼料中に均一に分布することが確認された (Appendix 3)。

安定性については、室温条件で保存した調製飼料を、調製日 (初回分析日) を 0 日として起算して、7 日、14 日および 21 日後に分析した。その結果、いずれの分析日にも低用量および高用量とも変動係数が 5%以下で、初回分析値を 100%とした場合に 97.4~100.8%で被験物質が残存しており、調製後 21 日間安定であることが確認された (Appendix 4)。

さらに、動物に給与する各用量群の調製飼料について、初回調製時、投与期間中約 3 ヶ月毎に 2 回および最終回調製時の計 4 回濃度を分析した。その結果、含有率が設定濃度の 98.8~102.5%の範囲で且つ変動係数が 5%以下で検出され、調製飼料の濃度は良好であることが確認された (Appendix 5-1~5-4)。

混合飼料中の被験物質の濃度分析の条件および方法を以下に示す。

1) 使用機器

高速液体クロマトグラフ (HPLC)

UV-VIS Detector	L-4200	株式会社 日立製作所
Intelligent Pump	L-6200	株式会社 日立製作所
Column Oven	L-5025	株式会社 日立製作所
Autosampler	AS-2000	株式会社 日立製作所
Degasser	ERC-3315 α	株式会社 イーアールシー

Millennium³² Chromatography Manager

	M32SW	日本ウォーターズ株式会社
HPLC データ処理装置	Empower 2	日本ウォーターズ株式会社
電子式上皿天秤	GH-202	株式会社 エー・アンド・デイ
小型冷却遠心機	CR5B	株式会社 日立製作所
	または CF7D2	日立工機株式会社
万能シェーカー	V-SX	イワキ産業株式会社
卓上型超音波洗浄器	B42JH	日本エマソン株式会社

2) 標準物質 (冷蔵庫内に保存)

DCBS (被験物質)	Lot No. 508001	大内新興化学工業株式会社 提供品
-------------	----------------	------------------

3) 試薬

蒸留水	分取クロマトグラフ用	和光純薬工業株式会社
アセトニトリル	高速液体クロマトグラフ用	和光純薬工業株式会社

4) 調製（以下の割合で調製）

a) 標準溶液

DCBS の 50 mg を正確に 100 mL 容のメスフラスコに量りとり、約 60 mL のアセトニトリルを添加した。卓上型超音波洗浄器で約 1 分間の超音波処理を行った後、アセトニトリルで定容し、500 ppm 溶液を調製した。この液を正確に 50 mL 容のメスフラスコに 1 mL 採取し、アセトニトリルで定容して 10 ppm 溶液とした（標準溶液）。調製は 1 回、HPLC への注入は 3 回とした。調製後は冷蔵庫内で保存し、7 日以内に使用した（調製日を 0 日として起算）。

b) 試料溶液の調製

被験物質混合飼料の採取点数は、濃度確認試験および安定性試験については被験物質混合飼料の中層から 3 点とし、均一性試験については被験物質混合飼料の上、中、下層から各 3 点の計 9 点とした。なお、均一性試験の中層の濃度を安定性試験の調製日の分析結果とした。

- ① 各被験物質混合飼料を 2 g 採取し、アセトニトリルを 40 mL 加えて万能シェーカーで 10 分間振とうした。
- ② 振とう後、遠心分離（3500 回転/分、10 分、15℃）し、得られた上清をフィルター（Millex®-LG、0.20 μ m、MILLIPORE）でろ過した。最初のろ液約 1 mL は捨て、その後のろ液を採取した。
- ③ ろ液の一定量を採取し、被験物質の最終濃度が 10 ppm 付近となるようにアセトニトリルで希釈したものを試料溶液とした。試料溶液の調製は 1 点につき 1 回、HPLC への注入は各 1 回とした。
- ④ 低用量についてはろ液の濃度が上記③の条件より低かった（ただし 2.5 ppm 以上）ので、上記②で得られたろ液を試料溶液とした。
- ⑤ 濃度確認試験で測定する対照群の飼料については、低用量群の混合飼料と同様の方法により試料溶液を調製した。調製は 3 回、HPLC への注入は各 1 回とした。

c) 移動相およびオートサンブラ洗浄液

蒸留水 50 mL にアセトニトリル 950 mL を加え、十分に混合したものを移動相およびオートサンブラ洗浄液とした。調製後は室温で保存し、24 日以内に使用した（調製日を 0 日として起算）。

5) HPLC 条件

カラム	: CAPCELL PAK SG120 C18、4.6 mm I.D. × 250 mm（株式会社 資生堂）
移動相	: 蒸留水/アセトニトリル（50:950）
測定波長	: 226 nm
カラム温度	: 35℃
流量	: 1 mL/min
注入量	: 10 μ L
オートサンブラ温度	: 10℃

分析時間 : 20 分
 オートサンプリング洗浄液 : 蒸留水/アセトニトリル (50:950)

6) 計算

Millennium³²またはEmpower 2を用いて標準溶液のピーク面積と濃度から作成した検量線より、各試料溶液の濃度（以下、測定濃度）を求め、以下の式より混合飼料中の被験物質濃度、変動係数、含有率および残存率を算出した。

被験物質濃度 (ppm) = [測定濃度 (ppm) × 希釈係数] / [混合飼料秤量値 (g)]

変動係数 (%) = (被験物質濃度標準偏差 / 被験物質濃度平均値) × 100

含有率 (%) = (被験物質濃度平均値 / 混合飼料の表示濃度) × 100

残存率 (%) = (保存後の被験物質濃度平均値 / 調製日の被験物質濃度平均値) × 100

7) 数値の表示

- a) 混合飼料の被験物質濃度は四捨五入して有効数字 3 桁に丸めた。ただし、3 桁以上の整数となる場合は小数点以下第 1 位を四捨五入し、整数表示とした。
- b) 含有率、残存率および変動係数は四捨五入して小数点以下第 1 位に丸めた。

8) 判定基準

- a) 濃度確認試験 : 含有率が 85～115%、変動係数が 5%以下の場合を適とした。
- b) 安定性試験 : 残存率が 85～115%、変動係数が 5%以下の場合を適とした。
- c) 均一性試験 : 変動係数が 5%以下の場合を適とした。

3. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社生産の Cr1:CD(SD) 系ラット (SPF) の雌雄を用いた。微生物モニタリングデータは、動物生産業者より入手した。ラットはこの種の試験で通常用いられている動物種であり、繁殖成績が安定していることと当研究所における背景対照データが利用できることからこの系統を選定した。

F0 世代用の動物として、雌雄各 114 匹を、2006 年 4 月 19 日に 4 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 80～93 g、雌で 65～77 g であった。受入時の一般状態観察で雌 1 匹に瞳孔偏位がみられたため、この動物は試験には使用しなかった。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について投与開始前 8 日間の検疫および馴化を行い、この間一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を動物受入日ならびに検疫および馴化期間最終日に測定した。

(3) 群分け

検疫および馴化期間最終日（投与開始日）に、検疫・馴化期間中に実施した一般状態観察および体重測定の結果異常のみられなかった動物のなかから、その日の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行い、F0 世代の親動物とした。これらの動物の体重範囲は、雄で 148～165 g、雌で 114～128 g であり、平均体重（雄、155.7 g；雌、121.1 g）の±20%以内であった。選抜から外れた動物は試験から除外後、エーテル麻酔下での放血により安楽死させた。

(4) 動物およびケージの識別

親動物は、群分け前は油性フェルトペンで尾に印を付けケージ内の個体識別を行った。群分け後は右耳介に群識別番号を、左耳介に群内個体識別番号を入れ墨した。

飼育ケージについては、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに試験番号および人荷時の動物番号を明記し各ケージの前面に標示した。群分け後は性別毎に色分けしたラベルに試験番号、試験群および動物番号（離乳児においては母動物番号）を明記し、各ケージの前面に標示した。さらに群毎に色分けしたシールをラベルに貼り群識別を行った。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

検疫および馴化期間ならびに試験期間中、動物は温度 $22\pm3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm20\%$ 、換気回数 10～15 回／時間、照明時間；人工照明（276～294 Lux）12 時間（8:00～20:00）のバリアシステムの動物飼育室（306 号室）で飼育した。動物飼育室の温度および湿度を毎日監視し、実測範囲はそれぞれ $20\sim25^{\circ}\text{C}$ および $32\%\sim80\%$ であった。

2) 飼育器材および飼育方法

雌雄別にブラケット式金属製金網床ケージ（300W×410D×200H、mm）に、検疫および馴化期間中は 3 匹、群分け後は 1 匹収容した。交配時は雄と雌を 1 匹ずつ、哺育期間の雌および離乳後剖検日までの離乳児は 1 腹を収容した。ケージおよび給餌器は群分け時に 1 回洗浄滅菌済のものと交換し、その後は、ケージは 2 週に 1 回（ただし、交配後の雌親動物については、妊娠 0 日、14 日および哺育 7 日に交換した）、給餌器は週 1 回（ただし、交配後の雌親動物については、妊娠 0 日、7 日、14 日および哺育 0 日、7 日および 14 日に交換した）、受皿は週 2 回交換した。自動給水装置の水抜きは週 1 回実施した。給水器を使用した場合は、週 2～7 回の頻度で交換した。妊娠 17 日以降および哺育期間中の雌は、同ケージの金網床を小型受皿に代えて、巢材として実験動物用床敷（ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社）を使用して分娩と哺育を行わせた。小型受皿の交換は、妊娠 20 日、哺育 7、14 および 18 日に実施した。動物飼育室内の清掃および床面清拭消毒は 1 日 1 回の頻度で実

施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を1週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製粉末飼料 CRF-1 を、金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の分析あるいは微生物検査を、使用したロット (060309、060411、060606 および 060908) の飼料について実施した。汚染物質の分析は財団法人日本食品分析センター、また微生物検査はオリエンタル酵母工業株式会社がそれぞれ行った。分析項目と許容値は株式会社化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも規定された許容値を超える値は認められなかった (Appendix 6-1～6-4 および 7-1～7-4)。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置または給水器を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の分析を、2006 年 4 月 3 日、2006 年 7 月 3 日、2006 年 10 月 2 日、2007 年 1 月 9 日および 2007 年 4 月 2 日に当該飼育室の最末端から試料を採取して実施した。分析は日本衛生株式会社において行った。分析項目と許容値は株式会社化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも規定された許容値を超える値は認められなかった (Appendix 8-1～8-5)。

(6) 被験物質の投与

投与群の動物には、被験物質を基礎飼料と混合して自由に摂取させた。対照群の動物には基礎飼料のみを与えた。飼料は、粉末飼料用金属製給餌器に入れて約 1 週間動物に与え、残余を廃棄した。食餌による投与経路は、化学物質の繁殖試験で通常用いられており、ヒトで予想される本被験物質の主たる暴露経路に一致していることから選択した。

(7) 投与期間

投与期間は、試験法ガイドラインに従って選定した。F0 親動物は群分け日から剖検日まで、F1 親動物は離乳日から剖検日まで連続して投与した。F0 および F1 親動物ともに、雄は約 15 週間、雌は約 17 週間であった。ただし、交配に要する期間が長かった数例では、雌で最長約 20 週間であった。なお、F1 および F2 離乳児には、離乳日から剖検日まで親動物と同じ試験群の飼料を与えた。

(8) 被験物質の投与量

用量設定試験 (S R O 5 2 4 1 P)⁶⁾ では、被験物質を 0 (基礎飼料のみ)、1500、3000、6000

および 10000 ppm の濃度で混合した飼料を、1 群当たり雌雄各 6 匹のCr1:CD(SD)ラットに、交配前 16 日間ならびに妊娠および哺育期間を通して摂取させた。その結果、親動物に対する影響として、3000 ppm 群では、雌のみ妊娠 7 日に体重および体重増加量の低値がみられた。6000 ppm 以上の用量群では、雌雄親動物の体重、体重増加量および摂餌量に低値傾向または有意な低値がみられた。器官重量では、6000 ppm 以上の用量群で、雄または雌親動物の肝臓重量の高値および雌親動物の脾臓重量の低値がみられた。10000 ppm 群の雌では、臨床所見として外尿道口周囲被毛汚染および血尿、剖検所見として胸腺の萎縮もみられた。親動物の繁殖能力に関する指標では、6000 ppm 以上の用量群で着床数の低値がみられた。一方、児動物に対する影響として、6000 ppm 以上の用量群で産児数の低値傾向または有意な低値がみられた。哺育児の体重は 1500 および 3000 ppm 群で低値傾向、6000 および 10000 ppm 群で有意な低値がみられた。10000 ppm 群では、哺育児の生存率の低下傾向もみられた。離乳児の脾臓重量にすべての用量群で低値傾向または有意な低値がみられた。

以上のことから、2 世代繁殖毒性試験の本試験では、母動物および児動物に明らかな影響を及ぼすと予測される 4500 ppm を最高用量とし、以下公比 7.5 で除して 600 および 80 ppm の 3 用量群と基礎飼料のみを同様に投与する対照群を設け、計 4 群を設定した。

(9) 試験の概要

試験の概要を Figure 1 に示す。

1) F0 親世代

a) F0 親動物の動物番号

試験群	群識別 の色	投与量 (ppm)	動物数 (動物番号)	
			雄	雌
対照	白	0	24(101～124)	24(151～174)
低用量	黄	80	24(201～224)	24(251～274)
中間用量	橙	600	24(301～324)	24(351～374)
高用量	赤	4500	24(401～424)	24(451～474)

対照群の動物には、被験物質投与群と同様の方法で基礎飼料のみを与えた。

b) 交配前投与期間

交配を開始する前に、雌雄とも 10 週間の投与期間を設けた。

c) 繁殖 (繁殖期)

① 交配開始時期

雌雄とも投与第 10 週終了後 (15 週齢) から交配を開始した。雌については、交配開始前に 2 週間性周期を調べた。

② 交配方法

雌を夕刻に同じ群の雄のケージに移し、1対1の連続同居方式で交配期間の限度を3週間として交配させた。ただし、低用量群の雄1例（動物番号206）に交配第2日にケージ内事故による鼻骨骨折が発生し一般状態が悪化して交配第7日に安楽死させたため、交配相手の雌は同日の夕刻以降既に交尾が確認された同じ群の別の雄と同居させた。なお、動物番号206は交尾率の評価から除外した。

毎朝、膣栓および膣垢中の精子を確認した。膣栓または膣垢中の精子のいずれかが認められた雌は交尾が行われたものと判断し、その日を妊娠0日とした。

③ 分娩観察

交尾確認雌動物は全例自然分娩させた。分娩状態を妊娠21日から25日まで毎日少なくとも3回（9:00、13:00 および 17:00）観察した。13:00に母動物が児を巣の中に集めて腹の下に抱え込んでいる場合に分娩終了と判断し、その日を哺育（生後）0日とした。

④ 哺育児数の調整

分娩の終了を確認した日を生後0日とし、生後4日に各腹の哺育児数が8匹となるように雌雄別に無作為に選抜した。選抜する哺育児の数は原則として雌雄同数としたが、1腹の雄または雌の哺育児数が4匹未満の場合は、総数が8匹となるよう（例えば雄3匹、雌5匹）に調整した。1腹の哺育児数が8匹以下の場合はそのまま哺育させた。

選抜哺育児の個体識別については、生後4日に哺育児の四肢に入れ墨することによって、腹内の識別を行った。F1親動物の選抜時は、補助として油性フェルトペンで尾にも印を付けた。

⑤ 哺育児の離乳

生後21日に行った。

d) F0世代の終了

雄は交配相手の雌の分娩の有無を確認後19～20週齢で、雌はF1哺育児の離乳後21～22週齢で安楽死させてF0世代を終了した。

2) F1親世代

a) F1親動物の選抜

各群のF1離乳児から雌雄それぞれ24匹を選抜してF1世代の親動物とした。離乳児の選抜は、全群を通じて最も多く出産が見られた日を含むようにして5日間の期間中に出産した腹から行った。各腹からの選抜児数を各性につき1匹または2匹とし、各群の平均体重をできるだけそろえた。

選抜されたF1親動物の個体識別はF0世代と同様の方法で行った。選抜されなかった残りのF1離乳児は生後26日に安楽死させ剖検した。

b) F1 親動物の動物番号

選抜された F1 離乳児には、以下の表に示す動物番号を与えた。

試験群	群識別 の色	投与量 (ppm)	動物数 (動物番号)	
			雄	雌
対照	白	0	24(1101～1124)	24(1151～1174)
低用量	黄	80	24(1201～1224)	24(1251～1274)
中間用量	橙	600	24(1301～1324)	24(1351～1374)
高用量	赤	4500	24(1401～1424)	24(1451～1474)

対照群の動物には、被験物質投与群と同様の方法で基礎飼料のみを与えた。

c) 交配前投与期間

雌雄とも選抜口（3 週齢）から 10 週間の交配前投与期間を設けた。

d) 繁殖（繁殖期）

雌雄とも投与第 10 週終了後（13 週齢）から交配を開始し、F0 親動物と同様の手順で F1 親動物の繁殖を行って F2 児を得た。ただし、3 週間の交配期間中に交尾が確認されなかった雌は、既に交尾が確認された同じ群の雄とさらに 7 日間を限度として同居させた。交配は兄妹交配を避けて行った。

e) F1 世代の終了

雄は交配相手の雌の分娩の有無を確認後 18 週齢で、雌は F2 哺育児の離乳後 19～23 週齢で安楽死させて F1 世代を終了した。

(10) 観察、測定および検査項目

1) F0 および F1 親動物

a) 一般状態観察

全例について、投与開始日から剖検日前日まで 1 日 2 回以上、剖検日は 1 回、個々の動物の生死、外観、行動等について観察した。異常が認められた場合は、種類、状態および持続期間を記録した。死亡した動物は発見後速やかに、衰弱の著しい動物は安楽死させて剖検した。

b) 体重測定

全例について、電子式上皿天秤（GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ）を用いて測定し記録した。雄は、投与開始日、投与期間中は 1 週毎、および剖検日に測定して記録した。雌は、投与開始日、交配前投与期間中は 1 週毎、妊娠・哺育期間は妊娠 0 日、7 日、14 日、20 日および哺育 0 日、4 日、7 日、14 日、21 日、ならびに剖検日に測定して記録した。交配期間が 1 週間を超えた雌は、交尾が確認されるまで相手雄の測定日と同じ日に測定して記

録した。死亡または安楽死させた例は発見日または安楽死させた日の体重を記録した。

c) 体重増加量

全例について、以下の基準で体重増加量を算出した。雄は、投与期間中ならびに剖検日の各体重値から投与開始日の体重値を減じて求めた。雌は、交配前投与期間、妊娠期間および哺育期間について、それぞれ投与開始日、妊娠 0 日および哺育 0 日の体重値を基準として算出した。剖検日の体重増加量は投与開始日の体重値を基準として算出した。

d) 摂餌量測定

全例について、雄は、投与期間中、剖検日を除いて 1 週毎に測定した。雌は、交配前投与期間中は 1 週毎、妊娠・哺育期間は妊娠 0 日、7 日、14 日、20 日および哺育 0 日、7 日、14 日、21 日に測定した。雌雄とも交配期間中の測定は行わなかった。電子式上皿天秤（GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ）を用いて各ケージの給与量または残量を測定した。飼料消費量を給与日数で除し、各群の 1 匹当たりの 1 日平均摂餌量（g/day）を算出した。哺育期間中の雌では、1 腹当たりの摂取量として表わした。

e) 被験物質摂取量

各投与群の雌雄について、交配前投与期間中および繁殖期間中における被験物質摂取量（mg/kg/day）を次の式から週毎に算出した。ただし、雌の繁殖期間中の被験物質摂取量は、妊娠 0-7 日、7-14 日、14-20 日、および哺育 0-7 日、7-14 日、14-21 日の各期間について求めた。

$$\text{被験物質摂取量 (mg/kg/day)} = \frac{\text{平均摂餌量 (g/rat/day)} \times \text{投与量 (ppm)}}{\text{平均体重 (g)}}$$

f) 自発運動量

F1 世代の無作為に抽出した各群雌雄 10 例について、生後 4 週齢時に 1 回、14:51~17:17 の間に自発運動量を測定した。ポリカーボネート製ケージ（285W×450D×210H, mm）に動物を 1 個体ずつ収容し、自発運動量測定システム（SUPERMEX、室町機械株式会社）を用いて実施した。データの収集間隔を 10 分として 60 分間測定した。

g) 水迷路試験

F1 世代の無作為に抽出した各群雌雄 10 例について、生後 6 週齢時に T 型水迷路⁷⁾により水迷路試験を行った。検査は 14:02~17:00 の間に実施し、水温は 22~23℃であった。1 日目に直路で 3 回の馴化試行を実施した。2 日目以降は 1 日 3 回の試行を連続 3 日間実施し、各試行中の過誤の回数と目標地点への到達時間を記録した。1 回の試行時間の限度を 3 分とし、これを超えた動物の場合はその時点での過誤の回数を記録した。

h) 繁殖能力

① 性成熟

F1 世代の全例について、雄では包皮分離および雌では膈開口を性成熟の指標として、そ

れぞれ生後 35 日および 25 日から毎日個々の動物を観察し、完了日の日齢および体重を記録した。

② 性周期

雌全例について、膣垢を採取し、ギムザ染色を施して顕微鏡で観察した。雌の性周期に伴う膣垢像の変化を、同居 2 週間前から交尾が確認されるまでの期間中調べた。観察期間中に 4～6 日間隔で発情期の膣垢像が得られた場合を性周期は正常と判定した。発情休止期が 7 日以上継続してみられた場合を連続非発情として性周期の異常と判定した。下記の式から群毎に正常性周期出現率を求めた。さらに、発情期間隔の計算の可能な個体から各群の平均発情期間隔を算出した。

$$\text{正常性周期出現率(\%)} = (\text{正常性周期を示す雌数} / \text{検査雌数}) \times 100$$

③ 交尾までの所要日数

同居開始後、交尾成立までの日数を算出した。

④ 交尾率

交尾の成立は、膣栓の有無および膣垢中の精子の有無で確認し、雌雄それぞれについて次の式から各群の交尾率を求めた。

$$\text{雄の交尾率(\%)} = (\text{交尾成立雄数} / \text{同居させた雄数}) \times 100$$

$$\text{雌の交尾率(\%)} = (\text{交尾成立雌数} / \text{同居させた雌数}) \times 100$$

⑤ 受胎率

妊娠の確認は、分娩の有無および剖検時に子宮内の着床痕の有無を調べることによって行い、雌雄それぞれについて次の式から各群の受胎率を求めた。

$$\text{雄の受胎率(\%)} = (\text{雌を妊娠させた雄数} / \text{交尾成立雄数}) \times 100$$

$$\text{雌の受胎率(\%)} = (\text{妊娠雌数} / \text{交尾成立雌数}) \times 100$$

⑥ 出産率

1 匹以上の生存児を出産したものを正常出産とした。次の式から各群の出産率を求めた。

$$\text{出産率(\%)} = (\text{生存児出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100$$

⑦ 妊娠期間

妊娠 0 日から哺育 0 日までの期間を妊娠期間として日数で表わした。

⑧ 哺育行動

哺育 0 日から 21 日まで毎日少なくとも 1 回、巣作りおよび授乳状態を観察した。

⑨ 着床数

剖検時に各雌の子宮内の着床痕の数を肉眼的に数えて記録した。それらの値から各群の 1 腹当たりの平均着床数を求めた。また、次の式から腹毎に分娩率を求めた。

$$\text{分娩率(\%)} = (\text{産児数} / \text{着床数}) \times 100$$

i) 精巣の精子頭部数

試験途中で死亡した動物または安楽死させた動物を除く雄全例について、剖検時に、精巣（右側）の白膜を除去して重量を測定後、精子頭部浮遊液を作製し、血球計算盤を用いて顕微鏡下で精子細胞の頭部を計数した。精子頭部数は総数および精巣 1 g 当たりの数として表わした。

j) 精巣上体の精子の数、運動能および形態

試験途中で死亡した動物または安楽死させた動物を除く雄全例について、剖検時に精子検査を実施した。精巣上体尾部（右側）を、重量測定後 0.5% 牛血清アルブミン（Bovuminar Cohn Fraction V pH 7.0 Powder、Serologicals Corporation）を添加した培養液（Medium 199、GIBCO）4 mL 中で 6 分割し、CO₂ インキュベーター内（37℃、5% CO₂）で 3～5 分培養して精子原液とした。この精子原液を適当な倍率で希釈してさらに培養した後、精子運動能解析装置（TOX IVOS、Hamilton Thorne Biosciences 社）を用いて精子の運動能を調べた。精子の運動能は自動性を示す精子の百分率（運動率）、良好精子の百分率、遊泳速度および遊泳パターンで表わした。精子数は、精子運動能の解析終了後の精子原液を希釈して血球計算盤を用いて顕微鏡下で計数し、精巣上体尾部当たりの数および精巣上体尾部 1 g 当たりの数として表わした。精子の形態は、塗抹染色標本作製して顕微鏡で各動物 200 個の精子を観察して異常形態精子の出現率を求めた。

k) 血液学的検査

各世代各群の、無作為に抽出した雌雄の親動物それぞれ 10 例について、剖検時にエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、EDTA・2K（ベノジェクトⅡ真空採血管、テルモ株式会社）で処理した血液約 1 mL を用いて、下記項目を検査した。検査終了後の血液は廃棄した。

①白血球数(WBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
②白血球百分比	
(Differential count of WBC)	May-Grünwald-Giemsa 染色(鏡検)

l) 血液化学的検査

各世代各群の、無作為に抽出した雌雄の親動物それぞれ 10 例について、剖検時にエーテル麻酔下で腹部大動脈より分離剤入り試験管（セパクリーン、栄研器材株式会社）に血液を採取した後、3500 回転/分で 10 分間の遠心分離で得られた血清を用いて下記項目を検査した。検査終了後の血清は、-20℃以下で凍結保存した。この血清は、最終報告書提出後廃棄する。

①総蛋白(TP)	ビウレット法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
②アルブミン(Albumin)	BCG 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
③グロブリン(Globulin)	TP と Albumin より算出

m) ホルモンレベル測定

各世代各群の、無作為に抽出した雌雄の親動物それぞれ 8 例について、剖検時にエーテル麻酔下で腹部大動脈より分離剤入り試験管（セパクリーン、栄研器材株式会社）に血液を採取した後、3500 回転/分で 10 分間遠心分離して血清を得た。なお、雌については、膣垢像で発情前期を確認した。

得られた血清は、超低温フリーザー MDF-293（三洋電機株式会社）（ -80°C 設定）で凍結して保存し、冷凍条件下で検査実施機関に輸送した。検査終了後の血清は、 -20°C 以下で凍結保存し最終報告書提出後廃棄する。さらに、血中被験物質濃度測定のための標本として、ホルモンレベル測定用として処理した血清から約 $200\ \mu\text{L}$ を分取し、超低温フリーザー MDF-293（三洋電機株式会社）（ -80°C 設定）で凍結して保存し最終報告書提出後廃棄する。

検査項目については、雄は、血清中テストステロン、ジヒドロテストステロン、LH および FSH、雌は、エストラジオール、プロゲステロン、LH および FSH の濃度を測定した。測定は株式会社パナファーム・ラボラトリーズで実施した。

ホルモンレベル測定の方法および成績は、株式会社パナファーム・ラボラトリーズで作成された試験報告書（Appendix 9）に示す。さらに、Appendix 9 に示した成績に基づき、統計学的解析を行った。

n) 病理学的検査

① 剖検

全例について、雄は交配相手の雌の分娩の有無を確認後に、雌は哺育児の離乳後に実施した。交尾の認められない雄については、交尾を確認した雄と同時期に実施した。出産の認められない雌ならびに異常出産または全哺育児の死亡がみられた雌については、哺育児を離乳した雌と同時期に実施した。また、試験途中で死亡した動物や瀕死のため安楽死させた動物は発見後速やかに剖検した。雌については、死亡例を除き、膣垢像で発情前期を確認した。

体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。検査終了後、以下の器官または組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。なお、精巣および精巣上体はブアン液で固定、70% エタノールに保存した。

脳、下垂体、脊髄（頸部、胸部、腰部）、胸腺、甲状腺（左右）、上皮小体（左右）、脾臓、心臓、胸部大動脈、食道、胃（前胃および腺胃）、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板含む）、盲腸、結腸、直腸、気管、肺（気管支含む）、腎臓（左右）、副腎（左右）、膀胱、精巣（左）、精巣上体（左右）、前立腺（腹葉）、精嚢（凝固腺含む、左右）、卵巣（左右）、子宮（角部および頸部）、膣、乳腺（右腹部）、皮膚（腹部）、胸骨（骨髄含む）、大腿骨（骨髄含む、右）、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節（左右）および肉眼的異常部位（正常組織との境界部含む）。

② 器官重量測定

試験途中で死亡した動物を除く全例について、剖検時に、電子式上皿天秤（ER-180A、エー・アンド・デイ株式会社）を用いて、固定する前に重量を測定して記録した。ただし、甲状腺（上皮小体含む）と精嚢は破損を防止するため固定後測定した。左右の表示のある器官は左右別々に測定し、合計としても表わした。

脳、下垂体、胸腺、甲状腺（上皮小体含む、左右）、肝臓、腎臓（左右）、脾臓、副腎（左右）、精巣（左右）、精巣上体（左右）、精嚢（凝固腺とともに分泌物含む）、前立腺（腹葉）、卵巣（左右）および子宮。

器官の絶対重量と剖検日に測定した動物体重から、次の式より相対重量を算出した。

$$\text{相対重量(\%)} = (\text{絶対重量} / \text{動物体重}) \times 100$$

③ 病理組織学的検査

対照群と高用量群では全例について、低用量および中間用量群では性周期の異常が認められた雌、異常出産がみられた雌および交尾または妊娠の証拠が得られなかった雌雄の組について、下記の器官または組織をパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して顕微鏡検査した。精巣については、精子形成の異常の有無を詳細に観察した。卵巣については、原始卵胞の有無を観察した。加えて、F1 雌では無作為に抽出した対照群および高用量群の各 10 例の卵巣（右側）について原始卵胞の数を数えた。

肝臓、下垂体、胸腺、甲状腺、腎臓、脾臓、副腎、骨髄（大腿骨）、腸間膜リンパ節、パリエル板、精巣（左側）、精巣上体（頭部、体部、尾部、左側）、精嚢、凝固腺、前立腺（腹葉）、卵巣、子宮、膈および乳腺。

また、肉眼的異常の認められた器官または組織についても病理組織学的検査を実施した。

2) F1 および F2 児動物

a) 一般状態および死亡の有無の観察

各腹の哺育児全例について、哺育期間中毎日観察して所見を記録した。離乳後は、次世代の親動物の選抜または剖検日まで毎日観察して所見を記録した。異常が認められた場合は、母動物の番号（個体識別後は個体番号）、児動物の性、異常の種類、状態および持続期間がわかるように記録した。死亡した動物は発見後速やかに剖検した。

b) 生存率

哺育児の生存率は、生後 0 日、4 日および 21 日に次の式から腹毎に求め、それらの値から各群の平均値を算出した。

$$\text{生後 0 日の生存率(\%)} = (\text{生後 0 日の生存児数} / \text{産児数}) \times 100$$

$$\text{生後 4 日の生存率(\%)} = (\text{生後 4 日の生存児数} / \text{生後 0 日の生存児数}) \times 100$$

$$\text{生後 21 日の生存率(\%)} = (\text{生後 21 日の生存児数} / \text{生後 4 日に選抜した児数}) \times 100$$

c) 産児数

生後 0 日に、正常に出産した腹毎に生存児数と死亡児数を数え、それらの合計を産児数とした。それらの値から各群の 1 腹当たりの平均産児数を求めた。

d) 性比

生後 0 日に、腹毎に児動物の性を、肛門と生殖突起の間の長さで判定して記録し、次の式から群毎に性比を求めた。

$$\text{性比} = \text{総雄産児数} / \text{総産児数}$$

e) 体重

各腹の生存哺育児全例について、生後 0 日、4 日、7 日、14 日および 21 日に、電子式上皿天秤（GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ）を用いて個体別に測定して、雌雄毎の腹当たりの平均体重を求めた。母動物数を標本数として各群の平均値を算出した。器官重量を測定する離乳児は、生後 26 日（剖検日）に体重を測定した。

f) 肛門生殖突起間距離

生後 4 日に、生存哺育児全例の肛門生殖突起間距離をノギス（デジマチックキャリパ、株式会社ミツトヨ）を用いて計測して記録した。雌雄毎に腹当たりの平均肛門生殖突起間距離を求め、さらに腹毎に平均体重の三乗根で除した値を求めた。母動物数を標本数として各群の平均値を算出した。

g) 発育分化

各腹の生存哺育児全例について、耳介開展を生後 1 日～4 日（児数調整前）まで、切歯萌出および眼瞼開裂をそれぞれ生後 8 日および 12 日以降完成するまで、個々の同腹児が発育分化を完成しているか否かを検査して腹毎に記録した。耳介開展については各観察日齢における同腹哺育児の完成率を、切歯萌出および眼瞼開裂については同腹哺育児の平均完成日齢をそれぞれ雌雄毎に算出した。

h) 反射反応性検査

各腹の生存哺育児のうち雌雄各 1 例（腹内識別番号の最も若い動物）について、正向反射、背地走性および空中正向反射を、それぞれ生後 5 日、8 日および 18 日に検査した。正向反射は、個体毎に 3 回の試行を実施し成功率（%）を求めた。さらに、立ち直りに要した時間を記録して 3 回とも成功した個体について中央値を求めた。背地走性は、動物が 180° 方向転換して頭部を上方へ向けるまでの時間を記録した。空中正向反射は、個体毎に 3 回の試行を実施し成功率（%）を求めた。正向反射および空中正向反射の成功率（%）ならびに正向反射および背地走性の反応時間（秒）は各群の平均値を算出した。背地走性は群毎に達成率（%）を算出した。

i) 病理学的検査

① 剖検

生後 4 日に選抜されなかった哺育児は全例その日に親動物の検査方法に準じて剖検した。F1 離乳児は F1 世代の親動物を選抜した残りの動物を、F2 離乳児はすべての動物をそれぞれ生後 26 日で同様に剖検した。ただし、生後 4 日に剖検した哺育児は二酸化炭素吸入法により安楽死させた。哺育期間中または離乳後剖検日までに死亡した児は発見後速やかに剖検して所見を記録した。なお、対照群の F1 雌親動物の 1 例が哺育 5 日に死亡したため、その腹の生存哺育児をその日（生後 5 日）に安楽死させて剖検した。

各群の次世代の親動物を選抜後の F1 離乳児および F2 離乳児のうち、各腹で腹内識別番号の最も若い雌雄それぞれ 1 匹（ただし、片方の性がない場合は他方の性のみ 1 匹）について、剖検後親動物と同じ器官または組織を親動物と同様の方法で固定して保存した。哺育期間中または離乳後剖検日までに死亡した児は剖検後全組織（whole body）を、また、生後 4 日に安楽死させた児および器官・組織の保存用として選択されなかった離乳児については肉眼的異常部位（正常組織との境界部含む）を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定して保存した。

② 器官重量測定

器官・組織の保存用として選択された F1 および F2 離乳児について、剖検時に下記の器官の重量を親動物と同様の方法でそれぞれ測定した。

脳、胸腺、肝臓、腎臓（左右）、脾臓、副腎（左右）、精巣（左右）、精巣上体（左右）、前立腺（腹葉）、卵巣（左右）および子宮。

器官の絶対重量と剖検日に測定した動物体重から、次の式より相対重量を算出した。

$$\text{相対重量}(\%) = (\text{絶対重量} / \text{動物体重}) \times 100$$

③ 病理組織学的検査

高用量（4500 ppm）群において F1 および F2 離乳児の雌雄ともに、胸腺および脾臓重量に有意な低値、肝臓重量に有意な高値がみられたため、対照群および高用量群の器官・組織を保存したすべての F1 および F2 離乳児の胸腺、脾臓および肝臓について、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して顕微鏡検査した。

4. 統計学的方法

体重、体重増加量、摂餌量、発情期間隔、交尾までの所要日数、妊娠期間、着床数、分娩率、産児数、精巣の精子頭部数、精巣上体の精子の運動能に関する各指標、精巣上体の精子数、異常形態精子の出現率、血液学的検査成績、血液化学的検査成績、ホルモンレベル、器官重量、性成熟完了日の日齢と体重、肛門生殖突起間距離、哺育児の生存率、発育分化の完成日齢、正向反射および背地走性の反応時間、ならびに自発運動量および水迷路試験の各指標については、

まず Bartlett の等分散性検定を行った（有意水準 5%）。その結果、各群の分散が等しい場合は、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べ（有意水準 10%）、群間に有意差が認められる場合は、Dunnett の検定法を用いて投与群と対照群の間の有意差を判定した（有意水準 5%および 1%）。一方、各群の分散が等しくない場合は、Kruskal-Wallis の検定法を用いて群間の有意差の有無を調べ（有意水準 10%）、群間に有意差が認められる場合は、Mann-Whitney の U-検定法を用いて投与群と対照群の間の有意差を判定した（有意水準 5%および 1%）。哺育児の雌雄別体重、雌雄別肛門生殖突起間距離、生存率および発育分化の完成日齢については、1 腹を標本単位として処理した。

原始卵胞数については、対照群と高用量群の検査後、まず 2 群の分散比の F 検定を行った（有意水準 5%）。その結果、等分散の場合は、Student の t 検定を用いて 2 群の平均の差を検定した（有意水準 5%および 1%）。一方、等分散でない場合は、Welch の検定を用いて 2 群の平均の差を検定した（有意水準 5%および 1%）。

児動物の腹毎の一般状態の観察所見および剖検所見の発生頻度、発育分化の同腹哺育児の完成率ならびに正向反射および空中正向反射の成功率については、Wilcoxon の順位和検定法を用いて投与群と対照群の間の差の有意差を判定した（有意水準 5%および 1%）。

親動物の一般状態の観察所見、剖検所見および病理組織学的所見の発生頻度、離乳児の病理組織学的所見の発生頻度、正常性周期出現率、交尾率、受胎率、出産率、児動物の性比および背地走性の達成率については、Fisher の正確確率検定法を用いた（有意水準 5%および 1%）。

成 績

1. F0 および F1 親動物に対する影響

(1) 一般状態 (Table 1 および 2; INDIVIDUAL DATA 1-1-1～1-4-4)

雄では、対照群の動物に異常所見は観察されなかった。80 および 600 ppm 群の F0 世代の各 1 例および 4500 ppm 群の F1 世代の 1 例では、ケージ内事故に起因する不正咬合、眼周囲または鼻部周囲被毛汚染がみられた。このうち 80 ppm 群の 1 例は、流涎、顔面の変形および腹部膨満もみられ衰弱が著しかったため投与 11 週に安楽死させた。

雌では、対照群の F0 世代で哺育期間に胸部の皮下腫瘍が 2 例に、ケージ内事故に起因する不正咬合、切歯破折、眼周囲または鼻部周囲被毛汚染が 3 例にみられた。80 ppm 群では、異常所見は観察されなかった。600 ppm 群では、F0 世代で妊娠および哺育期間に脱毛が 1 例にみられた。4500 ppm 群では、F0 世代で妊娠または哺育期間に脱毛が 2 例に、F1 世代でケージ内事故に起因する不正咬合、外尿道口周囲被毛汚染、眼周囲または鼻部周囲被毛汚染が 3 例にみられた以外に異常は観察されなかった。

対照群の F1 世代の雌の 1 例が哺育 5 日に死亡しているのが発見された。この動物では、死亡前に一般状態の変化は認められず、剖検でも異常はみられなかった。その他に死亡した動物はみられなかった。

被験物質投与群でみられた各所見の発生頻度では、80 ppm 群の F0 雌で哺育期間における異常所見の総発生頻度が有意な低値であった以外に、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(2) 体重 (Figure 2～5; Table 3 および 4; INDIVIDUAL DATA 2-1-1～2-4-4)

雄の体重は、80 および 600 ppm 群では、F0 および F1 のいずれの世代にも対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代の投与第 1 週から剖検日まで有意な低値がみられた。F1 世代では有意な差はみられなかった。

雌の体重は、80 および 600 ppm 群では、600 ppm 群の F0 世代の妊娠 7 日に対照群と比較して有意な高値がみられた以外に、いずれの世代にも有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代の投与第 1 週および妊娠 7 日から剖検日に有意な低値がみられた。F1 世代では有意な差はみられなかった。

(3) 体重増加量 (Table 5 および 6; INDIVIDUAL DATA 3-1-1～3-4-4)

雄の体重増加量は、80 および 600 ppm 群では、F0 および F1 のいずれの世代にも対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代において投与 0-1 週から剖検日まで有意な低値がみられた。F1 世代では有意な差はみられなかった。

雌の体重増加量は、80 および 600 ppm 群では、F0 世代の 80 ppm 群の投与 0-2 週および 600 ppm 群の妊娠 0-7 日に対照群と比較して有意な高値がみられた以外に、いずれの世代にも有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代の投与 0-1 週、妊娠 0-7、0-14、0-20 日および投与 0 週-剖検日に有意な低値がみられ、一方哺育 0-21 日に有意な高値がみられた。F1 世代では有意な差はみられなかった。

(4) 摂餌量 (Figure 6~9; Table 7 および 8; INDIVIDUAL DATA 4-1-1~4-4-4)

雄の摂餌量は、80 ppm 群では F1 世代の投与第 4 から 7 週、600 ppm 群では F1 世代の投与第 6 週に有意な低値がみられた以外に、対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代の投与第 1 から 8 週まで、第 13 および 14 週に、F1 世代の投与第 4 週に有意な低値がみられた。

雌の摂餌量は、80 および 600 ppm 群では、F0 および F1 世代とも対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代の投与第 1 週および、哺育 14-21 日に有意な低値がみられた。F1 世代では有意な差はみられなかった。

(5) 被験物質摂取量 (Table 9 および 10)

投与期間中の各投与群の平均被験物質摂取量 (mg/kg/day) は、F0 雄、F1 雄、F0 雌および F1 雌の順にそれぞれ次のような結果であった。80 ppm 群で 5.2、5.9、7.2 および 7.4、600 ppm 群で 39、44、54 および 55、4500 ppm 群で 291、331、416 および 417 であった。

(6) 繁殖能力

1) 性周期 (Table 11; INDIVIDUAL DATA 5-1-1~5-2-4)

雌の正常性周期出現率および発情期間隔には、いずれの世代においても被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。

2) 交尾率、受胎率、出産率、着床数および分娩率 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

雌雄の交尾率および受胎率ならびに雌の出産率、着床数および分娩率には、いずれの世代においても被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。

3) 交尾までの所要日数 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

交尾までの所要日数には、いずれの世代においても被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。

4) 妊娠期間 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

雌の妊娠期間には、いずれの世代においても被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(7) 精巣の精子頭部数、精巣上体の精子の数、運動能および形態 (Table 13 および 14;

INDIVIDUAL DATA 7-1-1~7-2-4 および 8-1-1~8-2-4)

精巣の精子頭部数、精巣上体の精子数、精子運動率、良好精子率、遊泳速度、精子の遊泳パターンならびに精巣上体における異常形態精子率には、4500 ppm 群で F1 世代の精子頭部の振幅 (ALH) に有意な低値がみられた以外に被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(8) 性成熟 (Table 15; INDIVIDUAL DATA 9-1~9-4)

F1 世代の雄の包皮分離完了の平均日齢および完了日の体重には、80 および 600 ppm 群では対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では完了の平均日齢に有意な延長がみられたが、完了日の体重には有意な差はみられなかった。

F1 世代の雌の膈開口完了の平均日齢および完了日の体重には、80 ppm 群では対照群と比較して有意な差はみられなかった。600 および 4500 ppm 群では、完了の平均日齢の有意な延長および完了日の体重の有意な高値がみられた。

(9) 自発運動量 (Table 16 および 17; INDIVIDUAL DATA 10-1-1~10-2-4)

F1 世代の雌雄とも、いずれのデータの収集間隔においても被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(10) 水迷路試験 (Table 18 および 19; INDIVIDUAL DATA 11-1-1~11-2-8)

F1 世代の雄では、いずれの項目にも被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

F1 世代の雌の 80 ppm 群では、いずれの項目にも対照群との間で有意な差はみられなかった。600 および 4500 ppm 群では、試行 2 日目 (T 型水迷路 1 日目) の目標地点への到達時間に対照群と比較して有意な高値がみられ、このうち 4500 ppm 群では同日の過誤回数にも有意な高値がみられた。しかし、試行 3 および 4 日目には、いずれの項目にも有意な差はみられなかった。

(11) 血液学的検査 (Table 20 および 21; INDIVIDUAL DATA 12-1-1~12-4-4)

雄の 80 および 600 ppm 群では、検査した項目に F0 および F1 のいずれの世代にも対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代のリンパ球の割合に有意な増

加がみられた。

雌の 80 ppm 群では、F0 および F1 のいずれの世代にも対照群と比較して有意な差はみられなかった。600 ppm 群では F1 世代のリンパ球の割合に有意な増加がみられたが、4500 ppm 群ではいずれの項目にも有意な差はみられなかった。

(12) 血液化学的検査 (Table 22 および 23; INDIVIDUAL DATA 13-1-1~13-4-4)

F0 および F1 世代の雄雌とも、いずれの項目にも被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。

(13) ホルモンレベル (Table 24 および 25; INDIVIDUAL DATA 14-1-1~14-4-4)

雄の 80 ppm 群では F1 世代においてテストステロンに対照群と比較して有意な高値、600 ppm 群では F1 世代において LH 濃度に有意な高値がみられたが、4500 ppm 群ではいずれの項目にも変化はみられなかった。

雌では、F0 および F1 世代ともいずれの項目にも被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。

(14) 病理学的検査成績

1) 剖検所見 (Table 26 および 27; INDIVIDUAL DATA 15-1-1~15-4-4)

交尾不成立または交配相手雌が妊娠不成立であった雄では、対照群の F1 世代において 1 例に腎盂拡張、80 ppm 群の F0 世代において投与 11 週に安楽死させた 1 例に切歯不正咬合、鼻骨の骨折および胃～盲腸のガス貯留が観察された。

妊性の確認された雄では、F0 または F1 世代の対照群を含む各群で、切歯不正咬合、回腸の憩室、回腸の漿膜面白色腫瘍、回腸の粘膜肥厚、腸間膜リンパ節の腫大、腎盂拡張、腎盂内微細白色顆粒、精巣および精巣上体の萎縮、あるいは精囊の小型が 1~3 例に観察された。

被験物質投与群におけるこれらの所見の発生頻度では、いずれにも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

妊娠不成立、生存児を出産しなかった雌または哺育途中で全哺育児の死亡がみられた雌では、対照群の F0 世代において子宮角部黄白色粘液貯留、回腸の憩室、膈の閉鎖が 1~2 例に、4500 ppm 群の F1 世代において大脳の脳室拡張が 1 例に観察された。

離乳児の得られた雌では、F0 または F1 世代の対照群を含む各群で、皮下黄白色または灰白色腫瘍、甲状腺の無形成（片側性）、胸腺の萎縮、腎盂拡張、尿管拡張、切歯破折または不正咬合、あるいは鼻骨変形が 1~3 例に観察された。

試験途中（哺育期間）に死亡した対照群の 1 例では異常はみられなかった。

被験物質投与群における異常所見の総発生頻度に、F0 世代の 80 および 600 ppm 群で有意

な低値および F1 世代の 4500 ppm 群で有意な高値がみられたが、個々の所見の発生頻度ではいずれも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

2) 器官重量 (Table 28 および 29; INDIVIDUAL DATA 16-1-1~16-4-4)

雄の 80 および 600 ppm 群では、80 ppm 群の F1 世代で胸腺の絶対および相対重量に偶発的と考えられる有意な低値がみられた以外に、測定したいずれの器官にも有意な変化は認められなかった。一方、4500 ppm 群では、肝臓で F0 世代の相対重量、F1 世代の絶対および相対重量に有意な高値がみられた。腎臓は両世代で相対重量に有意な高値がみられた。同群ではそのほか F0 世代で剖検時の体重の有意な低値、脳、甲状腺および精巣の相対重量に有意な高値、脾臓および副腎の絶対重量に有意な低値がみられた。F1 世代では脳の絶対重量および精囊の絶対および相対重量に有意な低値がみられた。

雌の 80 および 600 ppm 群では、用量相関性の認められない変動として、F0 および F1 世代で脳の絶対重量の有意な高値、F0 世代で脾臓の相対重量の有意な低値がみられた。加えて 80 ppm 群の F0 世代では下垂体の絶対重量にも有意な高値がみられた。一方、4500 ppm 群では、肝臓で F1 世代の絶対および相対重量に有意な高値または高値傾向がみられた。腎臓は両世代で相対重量に有意な高値がみられた。また、副腎では両世代で絶対および相対重量に有意な高値または高値傾向がみられた。同群ではそのほか F0 世代で剖検時の体重の有意な低値、脳の相対重量に有意な高値、脾臓の絶対重量に有意な低値がみられた。その他の測定した器官には変化はみられなかった。

3) 病理組織学的検査 (Table 30 および 31; INDIVIDUAL DATA 17-1-1~17-4-4)

対照群および 4500 ppm 群の雄全例の検査では、肝臓の小肉芽腫、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴、近位尿細管上皮の好酸性小体、尿細管上皮の再生、硝子円柱および前立腺の炎症性細胞浸潤が、F0 および F1 世代においてそれぞれ 5~8 例、14~24 例、14~24 例、1~8 例、2~5 例および 12~17 例に観察された。その他に、F0 または F1 世代において、対照群で腎盂粘膜の炎症性細胞浸潤、腎臓の嚢胞、腎盂拡張、精巣の精細管の萎縮、精巣上体の精子減少および管腔内細胞残屑、下垂体前葉の嚢胞、下垂体中間葉の嚢胞、下垂体中間葉の管状過形成、4500 ppm 群で腎臓の嚢胞、腎臓乳頭部鉍質沈着、腎盂拡張、精巣の精細管の萎縮、精巣上体の精子減少および管腔内細胞残屑、下垂体前葉の嚢胞、あるいは下垂体中間葉の管状過形成が 1~2 例に観察された。しかし、いずれの所見の発生頻度にも対照群と 4500 ppm 群の間で有意な差は認められなかった。

80 および 600 ppm 群の交尾不成立または交配相手雌が妊娠不成立であった F1 雄の検査では、80 ppm 群で肝臓の小肉芽腫、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴、近位尿細管上皮の好酸性小体、前立腺の炎症性細胞浸潤、600 ppm 群で肝臓の小肉芽腫、腎臓の近位尿細管上皮の硝

子滴、近位尿細管上皮の好酸性小体、尿細管上皮の再生、前立腺の炎症性細胞浸潤、下垂体前葉の嚢胞が1～3例に観察された。

雄の肉眼的異常部位の検査では、600 ppm 群の F0 世代で回腸の扁平上皮嚢胞、回腸の炎症性細胞浸潤および腸間膜リンパ節のリンパ球過形成が観察された。

対照群および 4500 ppm 群の雌全例の検査では、肝臓の小肉芽腫が F0 および F1 世代においてそれぞれ 5～12 例に観察された。その他に、F0 または F1 世代において、対照群で尿細管上皮の再生、腎盂粘膜の炎症性細胞浸潤、腎盂粘膜の鉍質沈着、子宮角部の炎症性細胞浸潤、膣の閉鎖、下垂体中間葉の嚢胞、下垂体中間葉の管状過形成、乳腺の腺癌、4500 ppm 群で尿細管上皮の再生、腎臓皮質の炎症性細胞浸潤、腎臓皮質の鉍質沈着、腎臓皮髄境界部の鉍質沈着、尿細管の拡張、硝子円柱、腎臓の嚢胞、下垂体中間葉の管状過形成、乳腺の腺癌、あるいは胸腺皮質の萎縮が 1～2 例に観察された。しかし、いずれの所見の発生頻度にも対照群と 4500 ppm 群の間に有意な差は認められなかった。

80 および 600 ppm 群において妊娠不成立、生存児を出産しなかった雌または性周期に異常のみられた F1 雌の検査では、80 ppm 群で肝臓の小肉芽腫、600 ppm 群で肝臓の小肉芽腫、尿細管上皮の再生、腎盂拡張および下垂体中間葉の嚢胞が観察された。

対照群の哺育 5 日に死亡した雌では、異常は観察されなかった。

雌の肉眼的異常部位の検査では、4500 ppm 群の F1 世代で脳室拡張が観察された。

4) 原始卵胞数 (Table 32; INDIVIDUAL DATA 18-1～18-2)

4500 ppm 群における F1 世代の雌の原始卵胞数に、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

2. F1 および F2 児動物に対する影響

(1) 一般状態 (Table 33 および 34; INDIVIDUAL DATA 19-1-1～19-4-4)

生後 0 日の観察では、F1 および F2 児の死亡が対照群を含む各群で 0.00～4.67% の発生頻度でみられ、その値は F2 雌の 80 ppm 群で有意に低下し、F2 雄の 4500 ppm 群で有意に増加した。その他に一般状態の変化はみられなかった。

生後 1-4 日の観察では、死亡（母動物に食べられたためと思われる児の消失を含む）が、F1 および F2 児において、対照群を含む各群で 0.91～12.56% の発生頻度でみられた。その他に、対照群の F1 雌で前肢の創傷および痂皮、80 ppm 群の F2 雌で後肢の痂皮、600 ppm 群の F2 雄で耳介の痂皮が各 1 例にみられた。しかし、いずれの所見の発生頻度にも対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。

生後 5-21 日の観察では、死亡（母動物に食べられたためと思われる児の消失を含む）が対照群を含む各群で 0.00～4.17% の発生頻度でみられた。その他に、80 ppm 群の F2 雄で小眼球

が1例に観察された。しかし、いずれの所見の発生頻度にも対照群と被験物質投与群の間で有意な差は認められなかった。

生後22-26日には、80 ppm群のF2雄で小眼球が1例、F1雌で死亡が2例観察されたが、いずれの所見の発生頻度にも対照群との間で有意な差は認められなかった。その他の動物には、一般状態の変化はみられなかった。

(2) 産児数 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

F1およびF2児の産児数には、被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(3) 性比 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

F1およびF2出産児の性比には、被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(4) 生存率 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

F1およびF2児の生後0、4および21日の生存率には、被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(5) 体重 (Figure 10 および 11; Table 35、43 および 44; INDIVIDUAL DATA 20-1-1~20-2-4 および 26-1-1~26-4-4)

F1およびF2児の哺育期間の体重は、80および600 ppm群では雌雄とも対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm群では、生後0日には雌雄とも対照群の値とほぼ同じであったが、生後4日以降体重増加の抑制がみられ、F1雌雄で生後4日以降に、F2雄で生後7、14および21日に、F2雌で生後14および21日に対照群と比較して有意な低値であった。さらに、4500 ppm群では、剖検日（生後26日）の体重にF1およびF2雌雄とも有意な低値がみられた。

(6) 肛門生殖突起間距離 (Table 36; INDIVIDUAL DATA 21-1-1~21-2-4)

F1およびF2児の生後4日における肛門生殖突起間距離には、雌雄とも被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(7) 発育分化 (Table 37; INDIVIDUAL DATA 22-1-1~22-2-4)

F1およびF2児の耳介開展の同腹哺育児の完成率および眼瞼開裂の同腹哺育児の平均完成日齢には、雌雄とも被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

切歯萌出の同腹哺育児の平均完成日齢では、80 ppm群のF1およびF2児の雌雄で有意な高値がみられたが、600 ppm群では有意な差はみられなかった。4500 ppm群ではF2児の雌雄において有意な高値がみられた。

(8) 反射反応性検査 (Table 38; INDIVIDUAL DATA 23-1-1～23-4-4)

F1 および F2 児の正向反射の成功率と反応時間、背地走性の達成率と反応時間および空中正向反射の成功率には、雌雄とも被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(9) 病理学的検査成績

1) 剖検所見 (Table 39～42; INDIVIDUAL DATA 24-1-1～24-4-4 および 25-1-1～25-4-4)

生後 4 日に選抜されなかった哺育児あるいは生後 0-4 日の間に死亡した児の剖検の結果、F1 および F2 雄または雌において、対照群で肝臓黄白色化、消化管ガス貯留、腎盂拡張、尿管拡張、前肢の痂皮、前肢の欠指、80 ppm 群で肝臓黄白色化、消化管ガス貯留、後肢の痂皮、600 ppm 群で消化管暗赤色内容物、耳介の痂皮、4500 ppm 群で消化管ガス貯留、腎盂拡張がそれぞれ 1～2 例に観察された。被験物質投与群におけるこれらの所見の発生頻度には対照群と比較して有意な差は認められなかった。

離乳児（生後 26 日）あるいは生後 5-26 日の間に死亡した児動物の剖検の結果、F1 および F2 雄または雌において、対照群で回腸の憩室、腎盂拡張、精巣および精巣上体の小型、80 ppm 群で小眼球、腺胃の多巣性粘膜微細暗赤色斑、回腸の憩室、腎盂拡張、膀胱の暗赤色内容物、600 ppm 群で回腸の憩室、腎盂拡張、4500 ppm 群で脳の脳室拡張、消化管ガス貯留、腎盂拡張、精巣および精巣上体の小型がそれぞれ 1～6 例に観察された。これらの所見のうち、600 ppm 群の F2 雄で腎盂拡張の発生頻度および F2 雌で異常所見の総発生頻度が有意に増加したが、4500 ppm 群ではいずれの所見の発生頻度にも有意な差はみられなかった。

2) 器官重量 (Table 43 および 44; INDIVIDUAL DATA 26-1-1～26-4-4)

雄の 80 ppm 群では、用量相関性の認められない変動として、F1 児で腎臓の相対重量に有意な高値、F2 児で脾臓の絶対および相対重量に有意な低値がみられた。600 および 4500 ppm 群では、肝臓の相対重量に F1 および F2 児とも有意な高値がみられ、腎臓の相対重量に F2 児で有意な高値がみられた。4500 ppm 群ではさらに、F1 および F2 児とも胸腺および脾臓の絶対および相対重量に有意な低値または低値傾向がみられた。同群ではこのほか、F1 および F2 児の剖検時の体重の有意な低値、F1 児で脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣上体および前立腺の絶対重量に有意な低値、脳および精巣の相対重量に有意な高値、F2 児で副腎の絶対重量に有意な低値、脳の相対重量に有意な高値がみられた。

雌の 80 ppm 群では、用量相関性の認められない変動として、F1 児で腎臓の相対重量に有意な高値、F2 児で胸腺の相対重量に有意な低値がみられた。600 ppm 群では、F1 児で卵巣の絶対重量に有意な低値、F2 児で肝臓および腎臓の相対重量に有意な高値がみられた。子宮では F2 児の絶対および相対重量に有意な低値がみられた。4500 ppm 群では、F1 および F2 児とも肝臓の相対重量に有意な高値がみられ、胸腺および脾臓の絶対および相対重量に有意な

低値または低値傾向がみられた。子宮では F1 児の絶対重量および F2 児の絶対および相対重量に有意な低値がみられた。同群ではこのほか、F1 および F2 児の剖検時の体重の有意な低値、F1 児で脳、肝臓、腎臓、副腎および卵巣の絶対重量に有意な低値、脳の相対重量に有意な高値、F2 児で脳の絶対重量に有意な低値、脳、腎臓の相対重量に有意な高値がみられた。

3) 病理組織学的検査 (Table 45; INDIVIDUAL DATA 27-1-1~27-4-2)

対照群および 4500 ppm 群の F1 および F2 離乳児について検査した肝臓、脾臓および胸腺ではいずれの動物にも変化はみられなかった。

考 察

DCBS を 0、80、600 および 4500 ppm (F0 雄 ; 0、5.2、39、291 mg/kg/day : F0 雌 ; 0、7.2、54、416 mg/kg/day : F1 雄 ; 0、5.9、44、331 mg/kg/day : F1 雌 ; 0、7.4、55、417 mg/kg/day 相当) の濃度で基礎飼料に混合して、1 群当たり雌雄各 24 匹の Cr1:CD(SD) ラットに 2 世代にわたって摂取させ、親動物の繁殖能力と児動物の発生・発育に及ぼす影響を検討した。

1. 親動物について

一般状態では、600 および 4500 ppm 群の F0 雌で脱毛がみられたが、自然発生する種類の変化であり発生頻度も低かったことから、DCBS 投与に関連する変化とは考えられなかった。また、投与期間中、対照群を含む各群の F0 および F1 雌雄に不正咬合、切歯破折、顔面の変形、眼周囲または鼻部周囲被毛汚染、外尿道口周囲被毛汚染などのケージ内事故に起因する所見がみられ、このうち 80 ppm 群の F0 雄 1 例は予後不良のため安楽死させた。そのほか、対照群で F1 雌 1 例が哺育 5 日に死亡しているのが発見されたが、剖検では異常はみられず偶発的な死亡と考えられた。

体重および体重増加量については、4500 ppm 群の F0 世代において、雄では投与期間を通じて、雌では投与開始直後および妊娠期間中または哺育期間中に有意な低値がみられ、DCBS 投与に関連する変化と考えられた。また、F0 世代の雌では、哺育 0-21 日の体重増加量に有意な高値がみられたが、この変化は哺育 0 日の体重が対照群より著しく低い値であったのに対し、哺育 21 日に対照群との差が縮まったことによるものと考えられた。このほか、80 および 600 ppm 群の F0 世代の雌で一時的に有意な高値がみられたが、用量相関性を欠き、また F1 世代で同様の変化がみられないことから毒性学的な意味はないと考えられた。

摂餌量については、4500 ppm 群の雄の F0 世代ではほぼ投与期間を通じて、F1 世代で投与第 4 週に、雌の F0 世代で投与第 1 週および哺育 14-21 日に有意な低値がみられ、DCBS 投与に関連する変化と考えられた。このほか、80 および 600 ppm 群の F1 世代の雄に有意な低値がみられたが、一過性且つ用量相関性がみられないことから、偶発的な変動と考えられた。

親動物の繁殖能力に関する指標では、4500 ppm 群の F1 世代において精子頭部の振幅に有意な低値がみられたが、精子数・形態等の他の指標に変化がみられないことや繁殖成績に影響がないことから、この変化の毒性学的意義は不明であった。その他の項目には、F0 および F1 世代のいずれの被験物質投与群においても、DCBS 投与に関連する変化は認められなかった。

F1 世代の性成熟のうち雄の包皮分離については、4500 ppm 群で分化完了の平均日齢に有意な延長がみられたが、完了日の体重に対照群との間に有意差がなかったことから身体発育の抑制に伴う変化と考えられた。一方、雌の膈開口については、600 および 4500 ppm 群で分化完了の平均日齢の有意な延長がみられたことに加えて、完了日の体重にも有意な高値がみられた。こ

の遅延は DCBS 投与に関連する変化と考えられ、身体発育の抑制以外の作用機構があるものと推察された。さらに離乳児の子宮重量に、F1 児で 4500 ppm 群の絶対重量、F2 児で 600 および 4500 ppm 群の絶対および相対重量に有意な低値がみられた。未成熟ラットの膣開口はエストロゲンの投与によって早まることから、そのプロセスにはエストロゲンが関与していると考えられており⁸⁾、またエストロゲンは未成熟ラットの子宮重量を増加させる作用を有するが、同時にエストロゲンアンタゴニストを投与するとその作用が抑制されることが知られている⁹⁾。従って、本試験における膣開口の遅延および離乳児の子宮重量の低値は DCBS の抗エストロゲン作用を示唆するものと考えられた。しかし、F0 および F1 親動物の血清中の性腺刺激ホルモンおよび性ホルモン濃度に影響はみられず、繁殖能力あるいは卵巣および子宮重量に変化がみられなかったため、その作用は軽微なものであると考えられた。

F1 雌雄の自発運動量には、被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。水迷路試験では、雌の 600 および 4500 ppm 群で試行 2 日目（T 型水迷路 1 日目）の目標地点への到達時間の有意な高値および 4500 ppm 群で同日の過誤回数の有意な高値がみられた。しかし、試行 3 日目（T 型水迷路 2 日目）以降ではこれらの項目に対照群と有意な差がないことから、600 および 4500 ppm 群の雌の水迷路試験における影響は軽微なものであると考えられた。

血液学的検査では、F0 雄の 4500 ppm 群および F1 雌の 600 ppm 群のリンパ球の割合が有意に増加したが、世代間の一貫性または用量相関性に欠けることから DCBS 投与と関連のない変化と考えられた。

血液化学的検査の結果には、被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

ホルモンレベルについては、F1 雄の 80 ppm 群でテストステロンに対照群と比較して有意な高値が、600 ppm 群で LH 濃度に有意な高値がみられたが、用量相関性に欠けることからいずれも DCBS 投与と関連のない変化と考えられた。

剖検では、不正咬合、腎盂拡張、回腸の憩室等の所見が散見されたが、いずれも発生頻度が低く DCBS 投与との関連性はないと考えられた。また、F0 雌の 80 および 600 ppm 群で異常所見の総発生頻度の有意な低値がみられたが、低値であることから毒性学的意味はないと考えられた。

器官重量については、4500 ppm 群で肝臓の絶対重量に F1 雌雄で、相対重量に F0 雄および F1 雌雄で有意な高値または高値傾向がみられた。肝臓重量の高値は用量設定試験⁶⁾においても雌では 6000 ppm 以上の用量で、雄では 10000 ppm 群でみられており、DCBS 投与に関連した変化と考えられたが、病理組織学的検査では変化がみられなかったことから影響は組織学的変化を起さない程度の軽微なものであったと考えられた。また、4500 ppm 群の腎臓の相対重量に F0 および F1 雌雄で、副腎の絶対および相対重量に雌の両世代で有意な高値または高値傾向がみられた。腎臓および副腎については、用量設定試験⁶⁾において雌雄の腎臓および雌の副腎重量の高値が 10000 ppm 群でみられており、また反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験⁵⁾の病理組

組織学的検査において雄の腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴および雌の腎臓の近位尿細管上皮の脂肪変性の発生頻度の増加が 100 mg/kg/day 以上の用量で、雌の副腎の皮質細胞空胞化の発生頻度の増加が 400 mg/kg/day の用量で報告されている。しかし、本試験では 4500 ppm 群の雌雄とも副腎の組織に異常はみられず、腎臓では同様の所見が雄で観察されたが、その出現頻度に対照群と 4500 ppm 群との間で有意差は認められなかったことから、重量変化の毒性学的意義は不明であった。このほか、精囊の絶対および相対重量に 4500 ppm 群の F1 雄で有意な低値（絶対重量 2.07g；相対重量 0.333%）がみられたが、病理組織学的検査で異常がみられなかったことに加えて、当試験機関における背景データ（絶対重量 1.90～2.40g；相対重量 0.319～0.427%）の範囲内に含まれていることから DCBS 投与との関連性はないと考えられた。80 ppm 群の F1 雄で胸腺の絶対および相対重量に、80 または 600 ppm 群の F0 または F1 雌で脳、下垂体および脾臓の絶対または相対重量に変動がみられたが、いずれも用量相関性に欠けるため DCBS 投与との関連性はないと考えられた。4500 ppm 群では F1 雄で脳の絶対重量に有意な低値（2.21g）がみられたが、相対重量に低値がみられないことと、当試験機関における背景データ（2.18～2.28g）の範囲内に含まれていることから毒性学的に意味のない変化と考えられた。また、同群の F0 雌または雄で脳、甲状腺および精巣の相対重量の有意な高値、脾臓および副腎の絶対重量の有意な低値がみられたが、これらは剖検時の体重の低値に起因する二次的変化と考えられた。

病理組織学的検査では、いずれの器官にも DCBS 投与に関連すると考えられる異常所見の増加はみられなかった。

4500 ppm 群の F1 雌の原始卵胞数では、DCBS 投与に関連した変化は認められなかった。

2. 児動物について

一般状態では、生後 0 日の死亡の発生頻度が F2 雄の 4500 ppm 群で有意に増加したが、雌雄合計した全児の生後 0 日の生存率是对照群との間で有意差がなかったことから死亡が偶然雄に偏ったものと考えられた。また、F2 雌の 80 ppm 群で生後 0 日の死亡の発生頻度が有意に低下したが、低下であることから毒性学的に意味のない変化と考えられた。その他に被験物質投与群で痂皮あるいは小眼球がみられたが、いずれも発生頻度が低いことから DCBS 投与との関連性はないと考えられた。

F1 および F2 児の産児数、性比、生存率、肛門生殖突起間距離および反射反応性検査では、いずれの被験物質投与群においても対照群との間で有意な差はみられなかった。

児動物の体重では、4500 ppm 群において生後 0 日には F1 および F2 雌雄とも対照群の値とほぼ同じであったが、生後 4 日以降に DCBS 投与に関連すると考えられる体重増加抑制が認められ、F1 雌雄で生後 4、7、14 および 21 日に、F2 雄で生後 7、14 および 21 日に、F2 雌で生後 14 および 21 日に、ならびに F1 および F2 雌雄の剖検日（生後 26 日）に有意な低値がみられた。

哺育児の発育分化では、耳介開展の完成率および眼瞼開裂の平均完成日齢には DCBS 投与の影響

響はみられなかったが、切歯萌出の平均完成日齢に 4500 ppm 群の F2 雌雄で有意な高値が認められ、体重増加抑制に起因する遅延と考えられた。このほか、80 ppm 群の F1 および F2 児の雌雄で切歯萌出の平均完成日齢に有意な高値がみられたが、用量相関性に欠けることから DCBS 投与とは関連のない変化と考えられた。

哺育途中または離乳後生後 26 日（剖検日）までに死亡した児、生後 4 日に選抜されなかった児および離乳児の剖検では、600 ppm 群の F2 離乳児で雄の腎盂拡張の発生頻度および雌の異常所見の総発生頻度が有意に増加したが、用量相関性がみられないことから毒性学的な意味はないと考えられた。その他の所見は、いずれも発生頻度が低く DCBS 投与との関連性はないと考えられた。

離乳児の器官重量については、肝臓の相対重量に 600 および 4500 ppm 群の F1 および F2 児の雄または雌で有意な高値、胸腺および脾臓の絶対および相対重量に 4500 ppm 群の F1 および F2 児の雌雄で有意な低値または低値傾向がみられた。しかし、病理組織学的検査においてこれらの器官に異常が全く観察されなかったことから、重量変化の毒性学的な意義は不明であった。このほか、F1 または F2 児の 80 ppm 群の雄または雌で腎臓、胸腺および脾臓の重量に変動がみられたが、いずれも用量相関性がないことから DCBS 投与との関連性はないと考えられた。また、600 ppm 群で F1 児の雌の卵巢の絶対重量に有意な低値、F2 児の雌雄の腎臓の相対重量に有意な高値がみられたが、絶対または相対重量のみの変化であり世代間の一貫性もみられないことから偶発的な変動と考えられた。4500 ppm 群では、F1 または F2 離乳児の雄または雌で脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣上体、前立腺、卵巢の絶対重量の有意な低値、脳、腎臓、精巣の相対重量の有意な高値がみられたが、いずれも体重の低値に起因する二次的変化と考えられた。

以上の結果から、DCBS 投与の F0 および F1 親動物に対する一般毒性的影響に関して、600 ppm 以上の用量で F1 雌の水迷路試験における影響、4500 ppm で雌雄の体重の増加抑制および摂餌量の抑制、雌雄の肝臓および腎臓重量ならびに雌の副腎重量の高値がみられた。繁殖能力については、600 ppm 以上の用量で F1 雌、4500 ppm の F1 雄の性成熟を遅らせたが、成熟後の繁殖能力には 4500 ppm の用量まで影響を及ぼさなかった。一方、F1 および F2 児動物に対しては、600 ppm 以上の用量で雌雄の肝臓重量の高値および雌の子宮重量の低値、加えて 4500 ppm では哺育期間中の児動物の体重増加抑制ならびに胸腺および脾臓重量の低値がみられた。

したがって、DCBS を 2 世代にわたってラットに投与した場合、親動物に対する一般毒性的影響に関しての無毒性量、親動物の繁殖能力に対する無毒性量および児動物に対する無毒性量はいずれも 80 ppm (5.2 mg/kg/day 相当) であると結論される。

参考文献

- 1) 平成 10 年度 既存化学物質の製造・輸入量に関する実態調査, 通商産業省. 1999.
- 2) IUCLID (International Uniform Chemical Information Data Base) Data Set, EU. 2000.
- 3) 環境省環境保健部環境安全課監修, 化学物質と環境. 2001.
- 4) Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, Toxikologische Bewertung Heidelberg. *N, N*-Dicyclohexyl-2-Benzothiazolsulfenamid. 242. 1994.
- 5) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 化学物質点検推進連絡協議会, 化学物質毒性試験報告 3:435-462. 1996.
- 6) *N, N*-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドのラットにおける2世代繁殖毒性試験: 用量設定試験 (試験番号 SR05241P)、最終報告書、株式会社化合物安全性研究所、2006 年.
- 7) Biel WC. Early age differences in maze performance in the albino rat. *J Genet Psychol.* 56:439-453. 1940.
- 8) Critchlow V and Bar-Sela M. Control of the onset of puberty. *In: Martini L, Ganong WF(eds.), Neuroendocrinology II.* New York, Academic Press, pp.101-162. 1967.
- 9) Geiser AG, Hummel CW, Draper MW, Henck JW, Cohen IR, Rudmann DG, Donnelly KB, Adrian MD, Shepherd TA, Wallace OB, McCann DJ, Oldham SW, Bryant HU, Sato M and Dodge JA. A new selective estrogen receptor modulator with potent uterine antagonist activity, agonist activity in bone, and minimal ovarian stimulation. *Endocrinology* 146:4524-4535. 2005.

Two-generation reproductive toxicity study in rats with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (SR05241)

Figures

- 1 Outline of the two-generation reproductive toxicity study in rats with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 2 Body weights of F0 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 3 Body weights of F1 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 4 Body weights of F0 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 5 Body weights of F1 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 6 Food consumption of F0 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 7 Food consumption of F1 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 8 Food consumption of F0 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 9 Food consumption of F1 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 10 Body weights of F1 rat pups in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 11 Body weights of F2 rat pups in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

Treatment week

- Quarantine and acclimatization
Assignment for F0 parental animals:
24 males and 24 females per dose level
- 1 F0 dosing begins
Pre-mating growth period
- 9 Determination of estrous cycles
- 11 F0 breeding begins
Mating
Gestation
Parturition
Lactation
Physical and functional development of F1 pups
Standardization of litter sizes
Measurement of anogenital distance
- 15 F0 male dosing end
Serum hormone concentrations
Hematological and blood chemical examination
Sperm motility, count and morphology
Gross necropsy
Organ weight, Histopathology
- 17 Weaning of F1 offspring
Gross necropsy, Organ weight
Histopathology
F0 female dosing end
Serum hormone concentrations
Hematological and blood chemical examination
Gross necropsy
Organ weight, Histopathology

Treatment week

- Selection for F1 parental animals:
24 males and 24 females per dose level
- 1 F1 dosing begins
Pre-mating growth period
Sexual development
Locomotor activity count
Learning tests
- 9 Determination of estrous cycles
- 11 F1 breeding begins
Mating
Gestation
Parturition
Lactation
Physical and functional development of F2 pups
Standardization of litter sizes
Measurement of anogenital distance
- 15 F1 male dosing end
Serum hormone concentrations
Hematological and blood chemical examination
Sperm motility, count and morphology
Gross necropsy
Organ weight, Histopathology
- 17 Weaning of F2 offspring
Gross necropsy, Organ weight
Histopathology
F1 female dosing end
Serum hormone concentrations
Hematological and blood chemical examination
Gross necropsy
Organ weight, Histopathology

Figure 1 Outline of the two-generation reproductive toxicity study in rats with N,N- Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

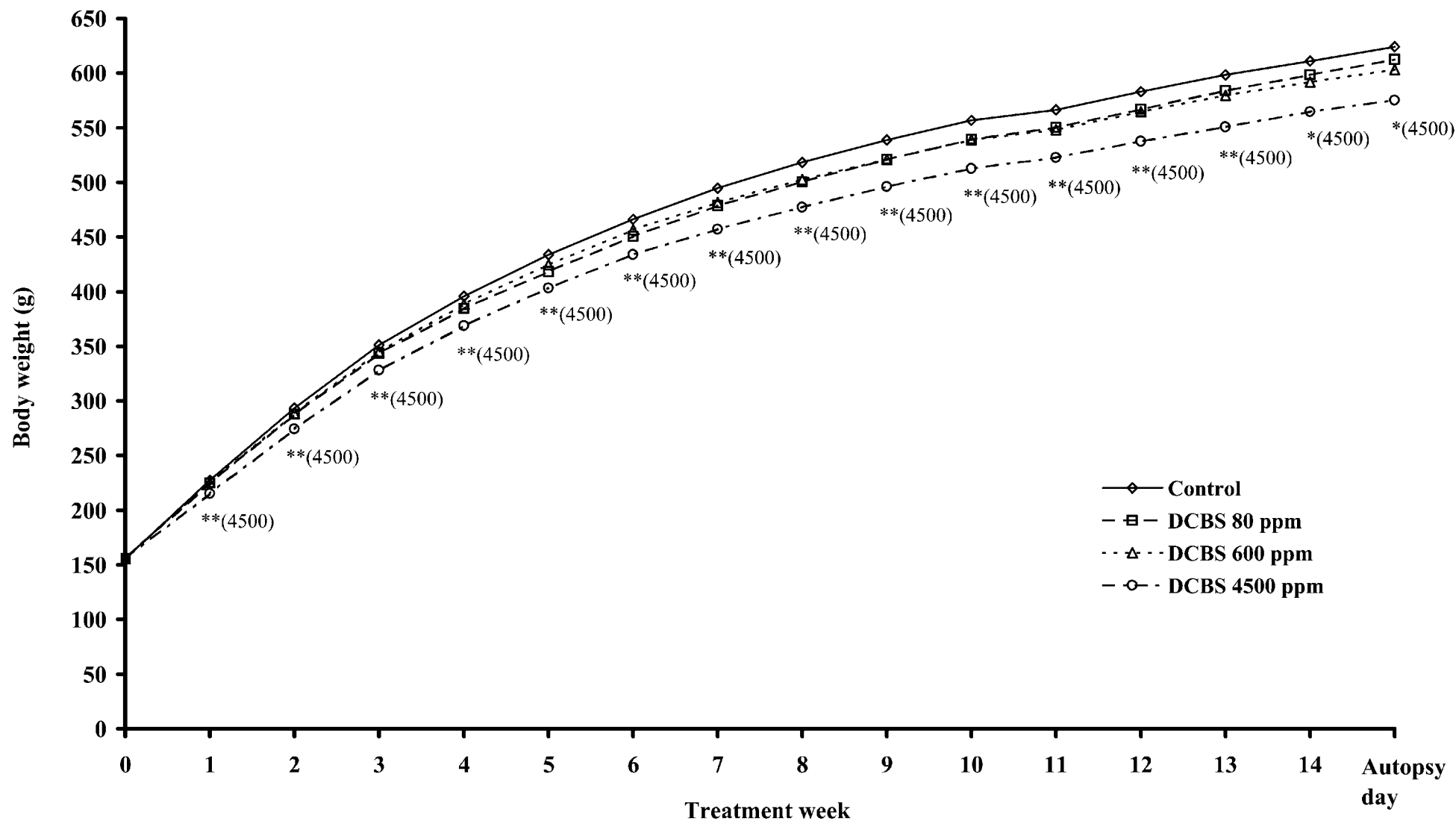


Figure 2 Body weights of F0 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

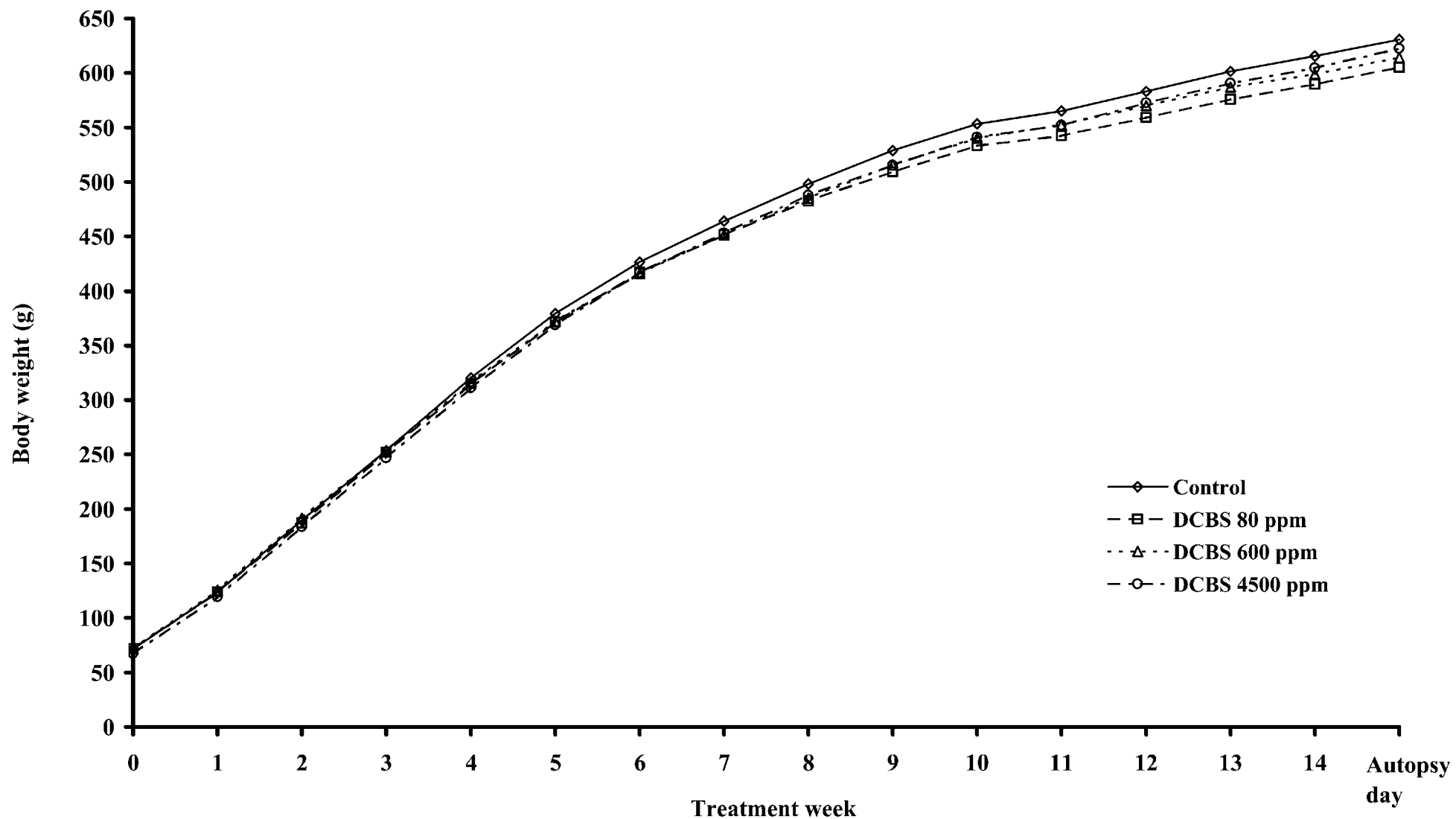


Figure 3 Body weights of F1 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

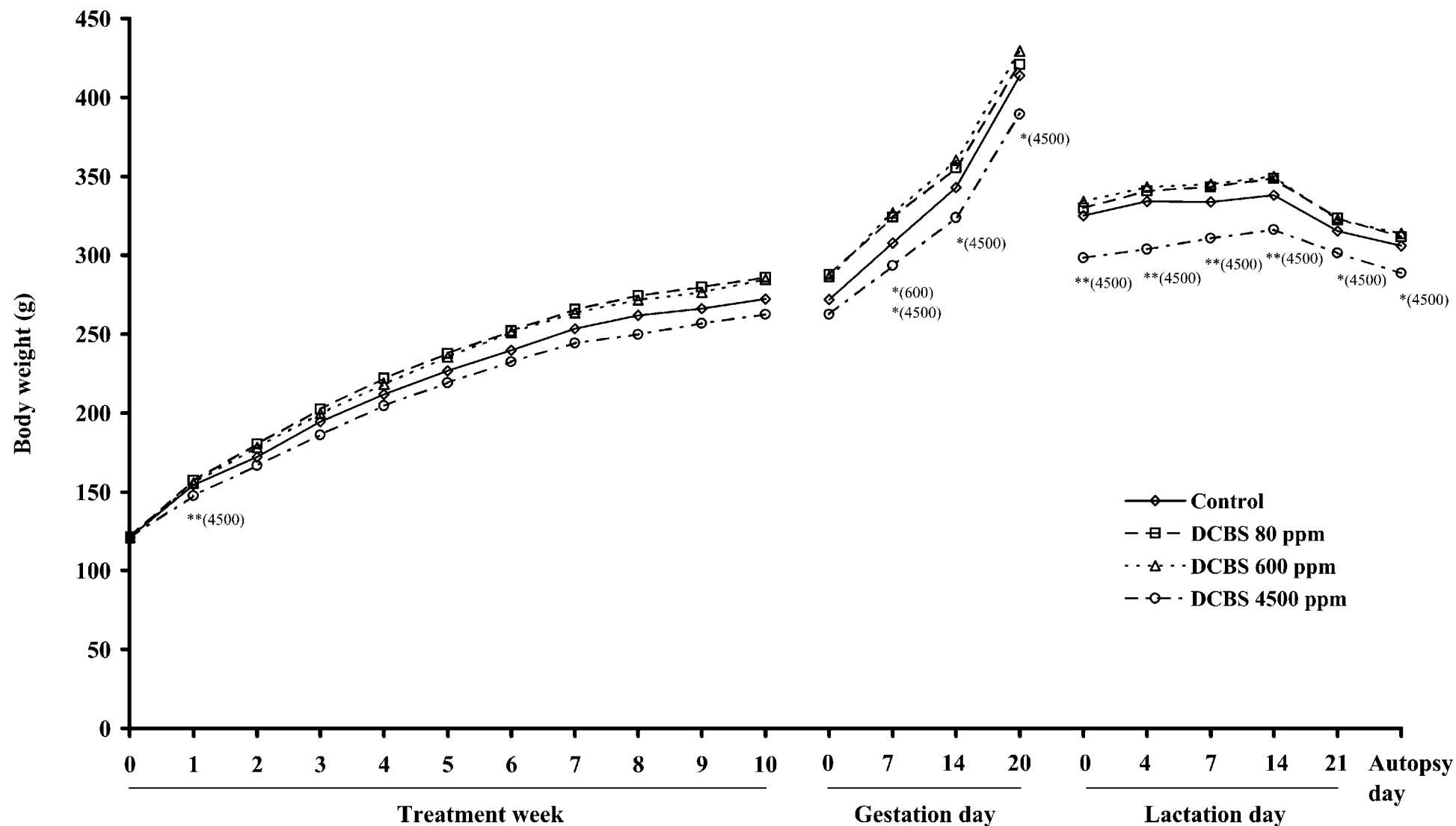


Figure 4 Body weights of F0 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

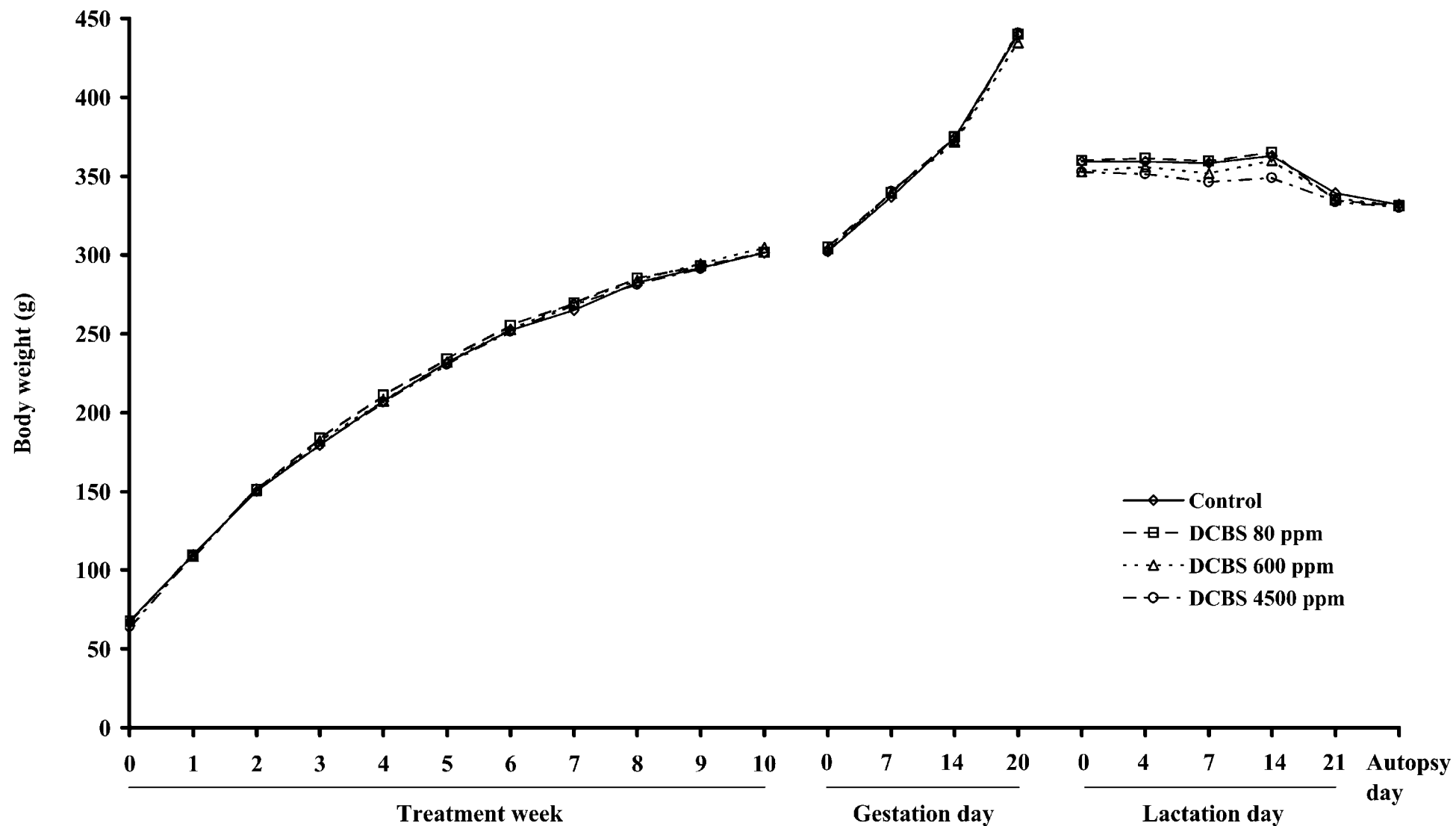


Figure 5 Body weights of F1 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

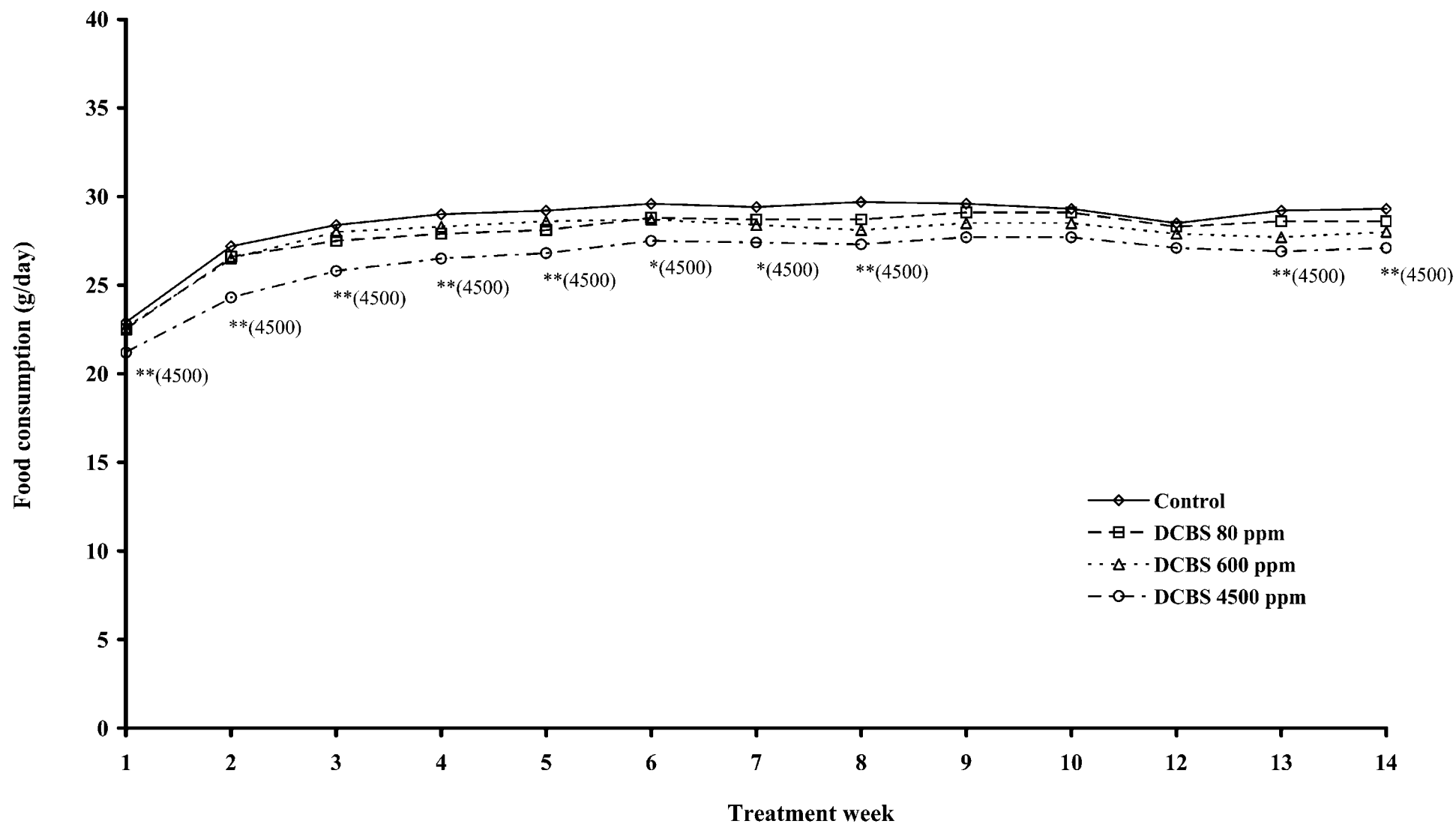


Figure 6 Food consumption of F0 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

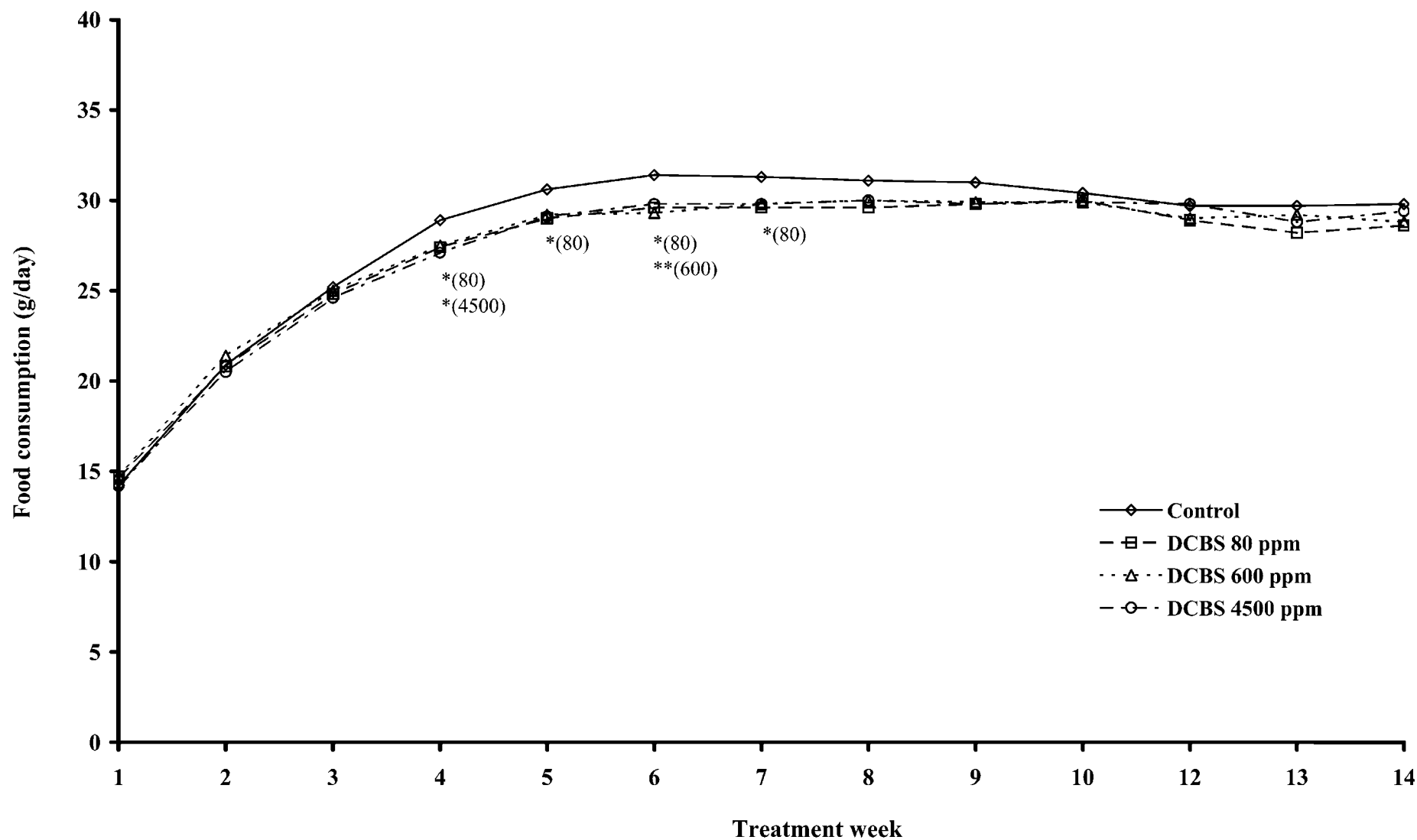


Figure 7 Food consumption of F1 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

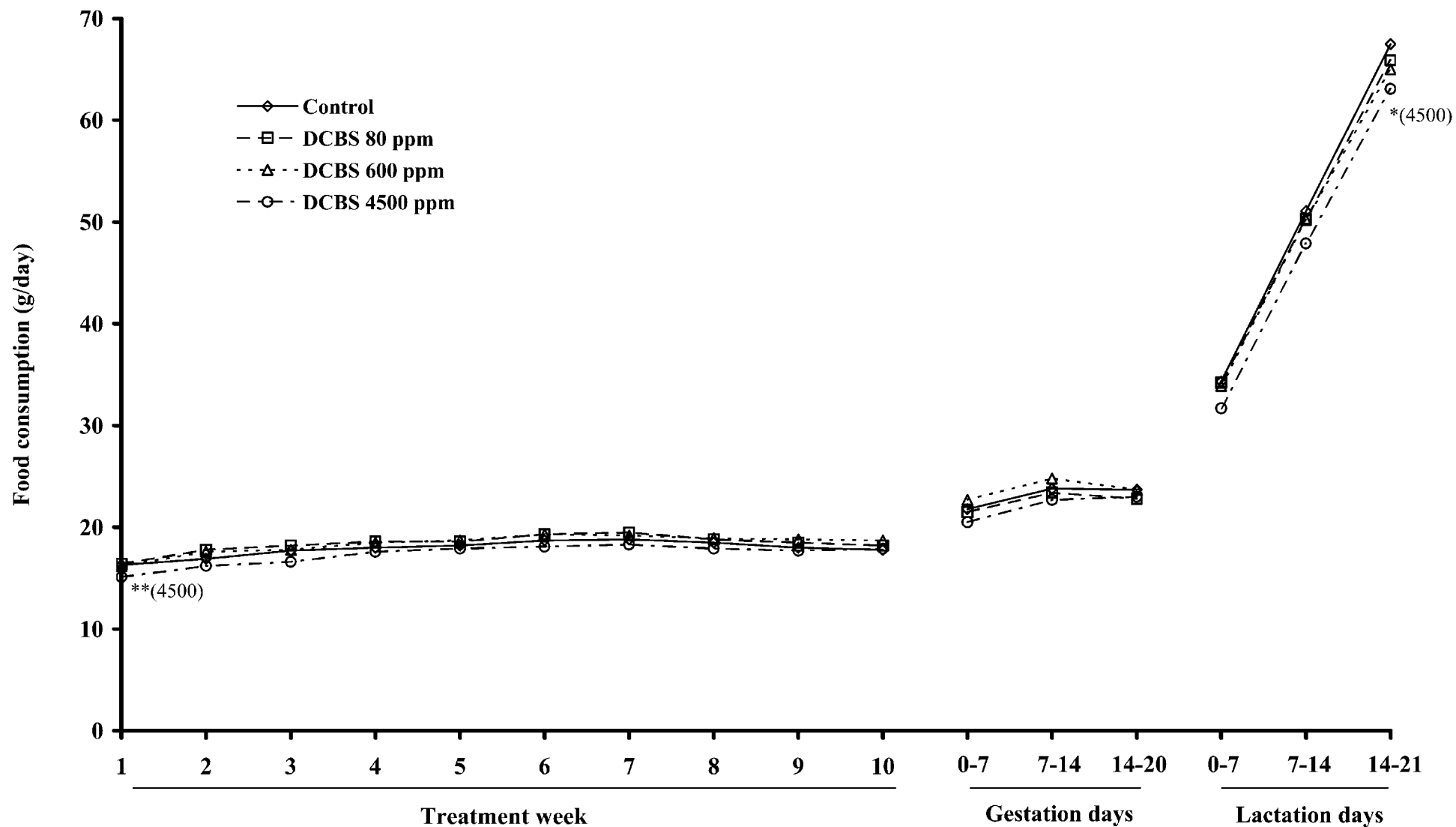


Figure 8 Food consumption of F0 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

** : Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

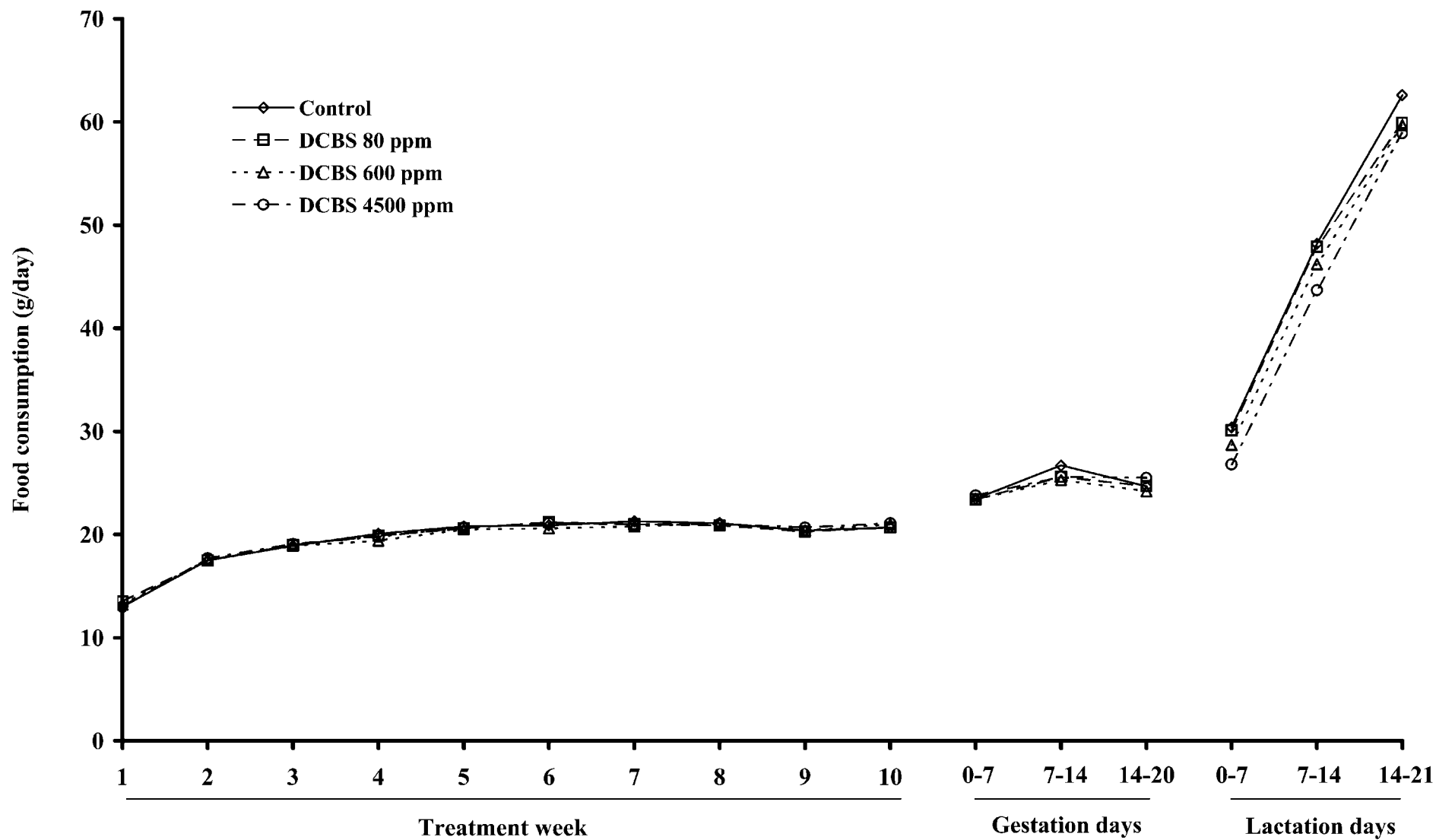


Figure 9 Food consumption of F1 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

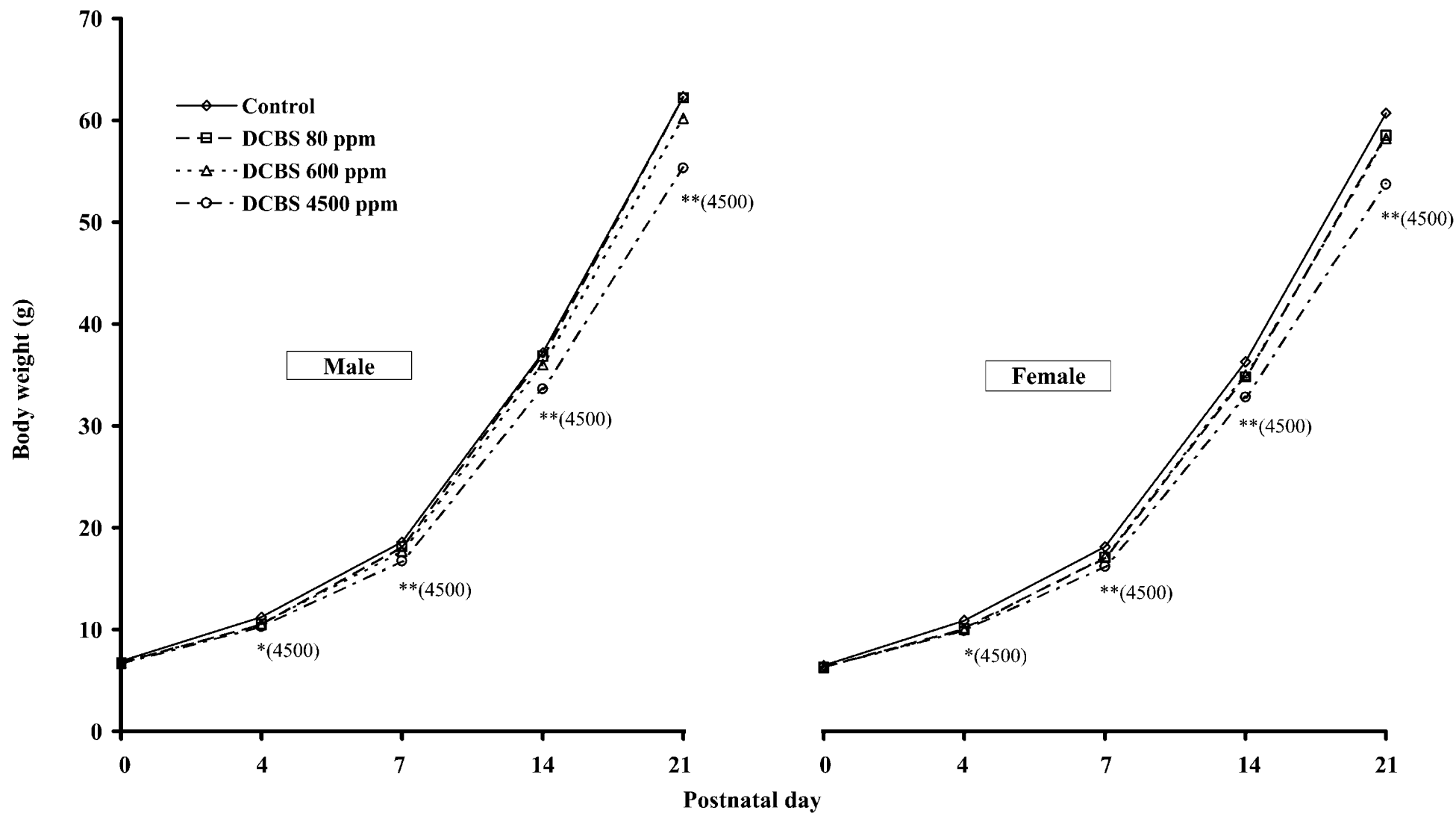


Figure 10 Body weights of F1 rat pups in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

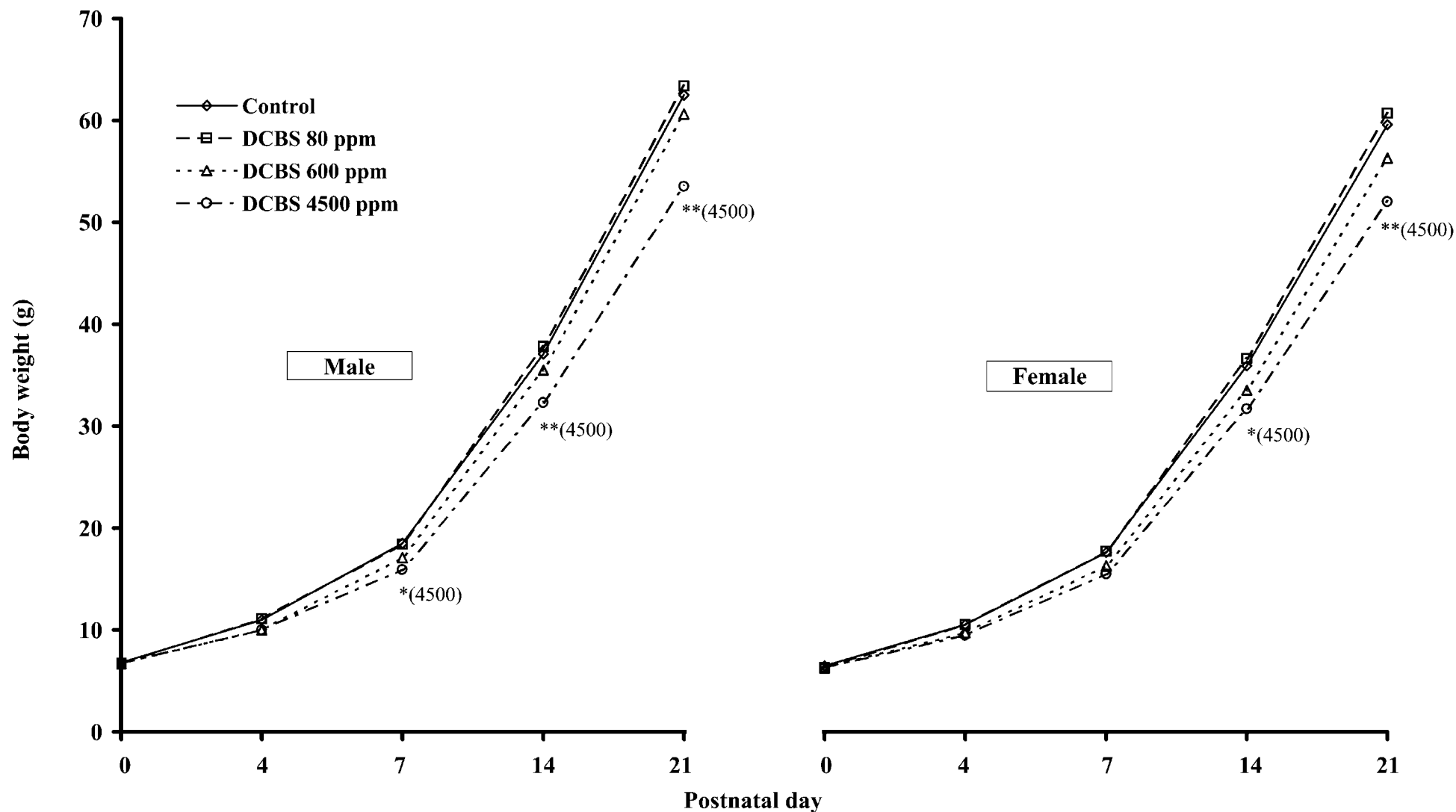


Figure 11 Body weights of F2 rat pups in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

Two-generation reproductive toxicity study in rats with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (SR05241)

Tables (1/3)

- 1 General appearance in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 2 General appearance in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 3 Body weights of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 4 Body weights of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 5 Body weight gains of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 6 Body weight gains of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 7 Food consumption of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 8 Food consumption of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 9 Test substance intake of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 10 Test substance intake of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 11 Vaginal estrous cycles in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 12 Reproductive findings in F0 and F1 parental rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 13 Sperm number and motility in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 14 Abnormal sperm ratio in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 15 Sexual development in F1 parental rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 16 Locomotor activity count in F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 17 Locomotor activity count in F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Two-generation reproductive toxicity study in rats with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (SR05241)

Tables (2/3)

- 18 Data on learning tests in F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 19 Data on learning tests in F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 20 Hematological findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 21 Hematological findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 22 Blood chemical findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 23 Blood chemical findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 24 Serum hormone levels in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 25 Serum hormone levels in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 26 Autopsy findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 27 Autopsy findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 28 Absolute and relative organ weights in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 29 Absolute and relative organ weights in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 30 Histopathological findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 31 Histopathological findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 32 Number of primordial follicles in F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Two-generation reproductive toxicity study in rats with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (SR05241)

Tables (3/3)

- 33 General appearance in F1 and F2 male rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 34 General appearance in F1 and F2 female rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 35 Body weights of F1 and F2 rat pups treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 36 Anogenital distance of F1 and F2 rat pups on postnatal day 4 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 37 Physical development in F1 and F2 rat pups treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 38 Reflex response tests in F1 and F2 rat pups treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 39 Autopsy findings in F1 and F2 male rat pups euthanized on postnatal day 4 or found dead on postnatal days 0-4 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 40 Autopsy findings in F1 and F2 female rat pups euthanized on postnatal day 4 or found dead on postnatal days 0-4 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 41 Autopsy findings in F1 and F2 male rat weanlings euthanized on postnatal day 26 or animals found dead on postnatal days 5-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 42 Autopsy findings in F1 and F2 female rat weanlings euthanized on postnatal day 26 or animals found dead on postnatal days 5-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 43 Absolute and relative organ weights in F1 and F2 male rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 44 Absolute and relative organ weights in F1 and F2 female rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)
- 45 Histopathological findings in F1 and F2 rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Table 1 General appearance in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Item	Pre-mating period				Breeding period			
		Control	DCBS (ppm)			Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500		80	600	4500
F0	Number of animals examined	24	24	24	24	24	24	24	24
	Number of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	1	1	0
	Findings ^a								
	Deformation of the face	0	0	0	0	0	1	0	0
	Malocclusion	0	0	0	0	0	1	1	0
	Salivation	0	0	0	0	0	1	0	0
	Soil of periocular fur/perinasal fur	0	0	0	0	0	1	1	0
	Abdominal distention	0	0	0	0	0	1	0	0
F1	Number of animals examined	24	24	24	24	24	24	24	24
	Number of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	1
	Findings ^a								
	Malocclusion	0	0	0	0	0	0	0	1
	Soil of periocular fur/perinasal fur	0	0	0	0	0	0	0	1

a: Values represent the number of animals that showed abnormal findings during each period.

Table 2 General appearance in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Item	Breeding period											
		Pre-mating period				Gestation period ^a				Lactation period ^b			
		Control	DCBS (ppm)			Control	DCBS (ppm)			Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500		80	600	4500		80	600	4500
F0	Number of animals examined ^c	24	24	24	24	22 (2)	24	24	24	22 (2)	24	24	24
	Number of animals with abnormal findings ^c	0	0	0	0	0 (0)	0	1	2	5 (0)	0 *	1	1
	Findings ^{c,d}												
	Malocclusion	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	2 (0)	0	0	0
	Crushing of incisors	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	1 (0)	0	0	0
	Soil of periocular fur/perinasal fur	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	3 (0)	0	0	0
	Subcutaneous mass	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	2 (0)	0	0	0
	Alopecia	0	0	0	0	0 (0)	0	1	2	0 (0)	0	1	1
F1	Number of animals examined ^c	24	24	24	24	23 (1)	22 (2)	21 (3)	24	23 (1)	22 (2)	21 (3)	24
	Number of animals with abnormal findings ^c	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1	1 (0)	0 (0)	0 (0)	3
	Findings ^{c,d}												
	Malocclusion	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3
	Soil of periocular fur/perinasal fur	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2
	Soil of perigenital fur	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
	Found dead	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0

Statistical analyses were made based on the total number of animals examined.

a: Including the mating period and delivery.

b: Including the period from weaning to autopsy.

c: Values in parentheses represent the number of animals that were non-pregnant and that did not produce viable pups.

d: Values represent the number of animals that showed abnormal findings during each period.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Fisher's exact probability test.

Table 3 Body weights of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals		Pre-mating period											Breeding period				Autopsy day
				Body weight (g) in treatment week															
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
F0	Control	24	Mean	155.6	227.5	293.5	351.3	395.7	433.9	466.4	494.6	518.4	538.9	556.9	566.4	583.0	598.4	611.1	624.4
			S.D.	4.7	8.4	15.5	22.9	28.7	33.9	40.1	45.3	49.6	54.4	59.1	60.0	64.1	67.6	70.3	76.0
	DCBS 80 ppm	24	Mean	155.9	224.8	287.7	343.3	384.3	418.3	450.6	478.4	500.2	521.0	539.2	(23)	(23)	(23)	(23)	(23)
			S.D.	4.6	7.5	12.1	20.3	24.9	30.7	35.6	41.4	44.3	47.0	48.8	49.7	53.7	56.5	59.0	61.0
	DCBS 600 ppm	24	Mean	155.6	225.9	288.7	345.2	388.6	424.6	456.8	481.5	502.5	521.0	538.8	548.3	564.6	579.5	592.0	603.4
			S.D.	4.6	9.0	14.2	20.0	25.2	29.4	35.3	39.0	42.1	42.8	46.1	44.9	45.9	46.6	48.3	51.2
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	155.7	215.4 **	274.4 **	327.9 **	368.8 **	403.3 **	434.0 **	457.0 **	477.2 **	496.2 **	512.6 **	522.5 **	537.8 **	550.8 \$\$	564.5 *	575.4 \$
			S.D.	4.5	6.2	10.5	16.0	21.0	25.5	27.3	28.5	30.9	32.4	36.0	35.8	38.0	37.8	41.1	42.3
F1	Control	24	Mean	71.8	124.0	189.8	253.8	320.2	379.4	426.4	463.9	498.2	528.8	553.3	565.1	583.2	601.4	615.3	630.7
			S.D.	6.4	10.6	13.7	15.1	18.6	23.5	30.5	37.2	44.3	49.2	54.0	55.9	62.4	67.5	68.0	74.7
	DCBS 80 ppm	24	Mean	71.6	123.6	187.0	251.9	315.1	371.2	416.8	451.4	482.5	509.3	533.3	542.4	559.0	575.8	589.8	605.1
			S.D.	6.4	9.7	13.6	17.0	20.7	23.3	27.8	29.7	32.7	36.4	39.8	38.8	42.2	43.8	44.5	47.7
	DCBS 600 ppm	24	Mean	71.8	125.6	191.8	253.3	316.5	372.4	416.0	451.5	485.1	515.7	540.3	552.3	570.0	586.9	598.9	614.2
			S.D.	7.7	12.4	15.2	17.7	20.9	23.5	26.7	32.5	37.4	40.9	44.3	45.3	48.8	49.3	52.7	52.5
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	67.2	119.6	183.8	246.7	311.0	368.6	416.7	453.2	487.7	515.1	540.9	552.0	572.6	590.5	604.3	622.6
			S.D.	7.9	12.9	18.6	22.9	27.3	29.4	31.3	35.5	37.3	40.8	41.9	45.7	48.1	49.7	50.8	51.8

Values in parentheses are the number of animals examined.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

^{\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Mann-Whitney U-test.

^{\$\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 4 Body weights of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals		Pre-mating period										Breeding period										
				Body weight (g)																				
																								Treatment week
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	0	7	14	20	0	4	7	14	21	
F0	Control	24	Mean	121.1	154.5	172.1	194.5	211.8	226.8	239.7	253.5	261.9	266.1	272.2	272.0	307.7	342.9	414.0	325.0	334.1	333.7	338.0	315.4	305.9
			S.D.	4.0	8.3	12.8	15.9	19.9	22.7	25.0	26.9	27.8	29.1	30.6	28.8	33.4	33.6	37.2	34.0	31.0	34.0	33.5	32.0	28.5
	DCBS 80 ppm	24	Mean	121.3	157.3	180.1	202.5	221.7	237.7	252.0	265.4	274.4	279.8	285.8	287.8	324.1	355.2	420.8	329.9	340.7	343.3	348.5	323.5	311.6
			S.D.	3.9	8.1	12.7	15.9	17.3	20.2	23.0	23.2	23.1	22.8	25.6	23.4	25.8	27.3	29.4	24.4	20.1	20.0	19.0	17.1	17.1
	DCBS 600 ppm	24	Mean	121.0	155.6	178.1	199.7	218.2	235.5	250.8	263.5	271.5	276.3	284.5	286.5	326.8 ^{\$}	360.2	429.4	334.1	343.2	345.1	349.9	322.5	313.7
			S.D.	3.8	7.5	11.5	15.0	16.4	17.3	18.9	21.3	20.7	21.5	23.2	22.3	21.3	23.7	25.4	19.1	21.9	21.5	18.2	17.6	17.8
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	121.0	147.6 ^{**}	166.5	185.9	204.5	219.2	232.4	244.4	249.8	256.6	262.4	262.4	293.3 ^{\$}	323.9 [*]	389.4 [*]	298.4 ^{\$\$}	303.6 ^{\$\$}	310.6 ^{\$\$}	316.3 ^{\$\$}	301.3 ^{\$}	288.5 ^{\$}
			S.D.	3.9	6.5	9.1	11.8	12.8	16.9	16.2	17.1	17.8	18.9	17.9	17.7	18.7	18.6	21.6	19.4	15.7	15.3	14.9	13.9	16.2
F1	Control	24	Mean	67.7	109.9	150.2	179.3	207.2	231.7	252.1	264.9	282.5	291.8	301.3	(23)	(23)	(23)	(23)	(23)	(23)	(22)	(22)	(22)	(22)
			S.D.	6.1	9.6	13.2	14.5	18.4	22.6	25.8	29.2	30.3	34.0	36.2	33.7	36.8	41.9	51.4	42.4	37.0	35.2	36.0	33.2	32.5
	DCBS 80 ppm	24	Mean	67.7	109.4	151.2	183.7	210.8	234.1	255.3	269.5	285.3	292.8	301.7	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)
			S.D.	6.1	8.0	9.9	13.4	18.3	21.9	26.1	27.7	29.4	33.0	34.2	34.0	37.5	40.3	45.8	43.9	40.9	38.1	27.3	26.3	28.5
	DCBS 600 ppm	24	Mean	67.7	109.0	150.6	182.2	207.3	232.1	252.7	269.6	283.6	294.2	304.7	(22)	(22)	(22)	(22)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)
			S.D.	7.2	10.5	11.8	13.0	15.9	20.2	21.1	22.7	24.2	26.5	26.2	24.8	26.9	25.5	32.5	27.7	22.3	22.7	24.1	23.9	23.1
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	64.3	108.7	151.5	179.5	206.5	230.6	251.6	268.1	281.3	291.4	301.7	(22)	(22)	(22)	(22)	(23)	(23)	(23)	(23)	(23)	(23)
			S.D.	7.5	9.2	10.5	12.1	13.6	16.0	20.4	21.8	22.6	25.3	27.8	27.1	28.5	32.0	36.1	36.2	34.7	34.8	37.0	33.1	30.8

Values in parentheses are the number of animals examined.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

^{\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Mann-Whitney U-test.

^{\$\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 5 Body weight gains of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals		Pre-mating period										Breeding period				0-Autopsy day
				Body weight gain (g) in treatment weeks														
				0-1	0-2	0-3	0-4	0-5	0-6	0-7	0-8	0-9	0-10	0-11	0-12	0-13	0-14	
F0	Control	24	Mean	71.9	137.8	195.6	240.0	278.3	310.8	339.0	362.8	383.3	401.3	410.8	427.4	442.8	455.5	468.8
			S.D.	6.0	13.4	21.1	26.9	32.2	38.4	43.6	48.0	52.7	57.4	58.2	62.3	65.8	68.4	74.1
	DCBS 80 ppm	24	Mean	69.0	131.8	187.4	228.5	262.4	294.8	322.5	344.3	365.1	383.3	394.0	411.0	428.0	442.4	456.4
			S.D.	4.2	9.3	17.9	22.8	28.7	33.7	39.5	42.4	44.9	46.7	47.5	51.4	54.4	57.0	59.0
	DCBS 600 ppm	24	Mean	70.3	133.1	189.6	233.0	269.0	301.2	326.0	347.0	365.5	383.3	392.7	409.0	424.0	436.4	447.8
			S.D.	5.7	11.3	17.9	23.0	27.2	33.0	36.7	39.7	40.4	43.7	42.5	43.4	44.0	45.8	48.8
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	59.7 **	118.7 **	172.2 **	213.1 **	247.5 **	278.3 **	301.3 **	321.5 **	340.5 **	356.9 **	366.8 **	382.0 **	395.1 ^{\$\$}	408.8 ^{\$\$}	419.7 ^{\$}
			S.D.	3.8	7.7	13.1	18.7	23.2	25.4	26.8	29.0	30.5	34.0	33.9	35.9	35.9	39.3	40.4
F1	Control	24	Mean	52.3	118.0	182.0	248.4	307.7	354.7	392.2	426.4	457.1	481.6	493.3	511.4	529.7	543.6	558.9
			S.D.	5.7	9.6	12.2	17.0	23.6	30.9	38.1	45.3	50.2	55.2	57.0	63.6	68.6	69.1	75.9
	DCBS 80 ppm	24	Mean	52.0	115.4	180.3	243.5	299.6	345.3	379.8	411.0	437.8	461.8	470.8	487.4	504.3	518.2	533.5
			S.D.	4.5	9.0	13.3	18.0	21.6	27.1	29.1	32.1	36.2	39.3	38.8	42.6	43.9	44.4	48.1
	DCBS 600 ppm	24	Mean	53.8	120.0	181.5	244.7	300.6	344.3	379.7	413.3	443.9	468.5	480.5	498.2	515.1	527.1	542.4
			S.D.	5.3	9.3	13.4	17.3	21.5	25.5	31.2	36.1	39.9	43.3	44.4	48.3	48.6	52.2	52.3
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	52.5	116.6	179.5	243.8	301.5	349.5	386.0	420.5	447.9	473.7	484.8	505.4	523.3	537.2	555.4
			S.D.	5.8	12.1	16.5	21.2	23.7	25.9	30.4	32.7	36.3	37.8	41.5	43.7	45.5	46.7	48.2

Values in parentheses are the number of animals examined.

** : Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

^{\$} : Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Mann-Whitney U-test.

^{\$\$} : Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 6 Body weight gains of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group		Number of animals	Pre-mating period										Breeding period							
				Body weight gain (g)										Gestation days			Lactation days				0-Autopsy day
				Treatment weeks										0-7	0-14	0-20	0-4	0-7	0-14	0-21	
				0-1	0-2	0-3	0-4	0-5	0-6	0-7	0-8	0-9	0-10								
F0	Control	24	Mean	33.5	51.0	73.4	90.7	105.8	118.6	132.5	140.8	145.0	151.1	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)
			S.D.	6.4	11.0	13.9	17.8	20.7	22.7	24.6	25.7	26.9	28.4	7.7	11.2	19.3	10.6	17.8	17.7	15.9	26.4
	DCBS 80 ppm	24	Mean	36.0	58.9 *	81.3	100.5	116.4	130.7	144.1	153.1	158.5	164.6	36.3	67.4	133.0	10.8	13.4	18.5	-6.4	190.3
			S.D.	6.0	10.7	13.8	15.5	18.5	21.3	21.5	21.6	21.3	24.0	6.1	9.1	11.4	8.8	11.0	13.2	12.6	15.5
	DCBS 600 ppm	24	Mean	34.6	57.0	78.7	97.1	114.4	129.8	142.5	150.5	155.2	163.5	40.4 *	73.7	143.0	9.1	11.0	15.8	-11.5	192.7
			S.D.	5.9	10.3	13.7	15.6	16.6	18.4	20.7	20.2	21.0	22.9	5.4	9.6	12.7	10.7	9.2	9.4	10.5	17.0
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	26.6 **	45.5	64.9	83.5	98.2	111.4	123.4	128.8	135.6	141.4	30.9 *	61.5 **	127.0 ^{\$\$}	5.2	12.2	17.9	2.8 *	167.5 ^{\$}
			S.D.	5.6	8.1	10.4	11.8	15.9	15.2	15.5	16.5	17.8	16.9	5.1	6.2	12.3	10.2	13.7	14.3	18.0	14.5
F1	Control	24	Mean	42.3	82.5	111.6	139.5	164.0	184.5	197.3	214.8	224.2	233.6	(23)	(23)	(23)	(23)	(22)	(22)	(22)	(22)
			S.D.	4.2	9.4	11.8	15.6	19.8	23.5	26.9	27.8	31.6	34.1	7.6	12.3	26.8	9.8	15.0	17.9	21.1	30.3
	DCBS 80 ppm	24	Mean	41.7	83.5	116.0	143.1	166.4	187.5	201.8	217.6	225.0	234.0	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)
			S.D.	3.3	6.7	12.0	16.5	20.4	24.5	26.1	28.4	32.0	33.2	6.2	11.0	20.1	11.8	13.4	22.7	28.5	27.3
	DCBS 600 ppm	24	Mean	41.3	82.9	114.5	139.5	164.4	185.0	201.9	215.9	226.5	237.0	(22)	(22)	(22)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)
			S.D.	5.7	8.2	10.9	13.3	17.7	18.8	21.2	22.7	25.0	24.9	6.4	9.9	21.9	11.3	12.6	19.0	16.7	20.9
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	44.4	87.3	115.3	142.3	166.3	187.3	203.8	217.0	227.1	237.4	(22)	(22)	(22)	(23)	(23)	(23)	(23)	(23)
			S.D.	4.1	7.9	12.4	12.9	16.2	20.8	21.9	23.2	26.4	29.0	9.0	11.5	17.7	11.9	17.2	27.0	32.1	31.1

Values in parentheses are the number of animals examined.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.^S: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Mann-Whitney U-test.^{SS}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 7 Food consumption of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Pre-mating period										Breeding period		
				Food consumption (g/day) in treatment week										12	13	14
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
F0	Control	24	Mean	22.9	27.2	28.4	29.0	29.2	29.6	29.4	29.7	29.6	29.3	28.5	29.2	29.3
			S.D.	1.1	1.9	2.5	2.7	2.7	2.7	2.6	2.8	3.0	2.9	2.7	2.8	2.8
	DCBS 80 ppm	24	Mean	22.5	26.6	27.5	27.9	28.1	28.8	28.7	28.7	29.1	29.1	(23)	(23)	(23)
			S.D.	0.9	1.6	2.4	2.4	2.5	2.8	2.9	2.6	2.8	2.5	2.7	3.0	2.9
	DCBS 600 ppm	24	Mean	22.6	26.5	28.0	28.3	28.6	28.7	28.4	28.1	28.5	28.5	27.9	27.7	28.0
			S.D.	1.3	1.7	2.1	2.3	2.3	2.4	2.3	2.5	2.4	2.5	2.2	2.0	2.2
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	21.2 **	24.3 **	25.8 **	26.5 **	26.8 **	27.5 *	27.4 *	27.3 **	27.7	27.7	27.1	26.9 **	27.1 **
			S.D.	0.9	1.6	1.9	1.9	2.0	1.8	1.8	2.1	2.3	2.1	2.0	1.9	2.2
F1	Control	24	Mean	14.2	20.9	25.2	28.9	30.6	31.4	31.3	31.1	31.0	30.4	29.7	29.7	29.8
			S.D.	1.3	1.8	2.0	2.0	2.3	3.0	3.1	3.0	2.7	2.8	2.8	2.8	2.8
	DCBS 80 ppm	24	Mean	14.7	20.8	24.8	27.4 *	29.0 *	29.6 *	29.6 *	29.6	29.8	30.0	28.9	28.2	28.6
			S.D.	1.1	1.6	1.7	1.9	1.9	2.2	2.0	1.8	1.9	2.1	2.3	2.3	1.8
	DCBS 600 ppm	24	Mean	14.8	21.4	25.0	27.5	29.2	29.3 **	29.8	30.0	29.9	29.9	(22)	(22)	(22)
			S.D.	1.3	1.3	1.2	1.6	1.9	1.9	2.2	2.2	2.1	2.0	2.1	1.9	2.3
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	14.2	20.5	24.6	27.1 *	29.1	29.8	29.8	30.0	29.8	29.9	(23)		
			S.D.	1.4	2.2	2.4	2.7	2.5	2.0	2.2	2.4	2.3	2.3	3.3	2.9	2.8

Values in parentheses are the number of animals examined.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

Table 8 Food consumption of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Pre-mating period										Breeding period					
				Food consumption (g/day)										Gestation days			Lactation days		
				Treatment week										Gestation days			Lactation days		
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	0-7	7-14	14-20	0-7	7-14	14-21
F0	Control	24	Mean	16.3	16.9	17.7	18.0	18.2	18.7	18.8	18.5	18.0	17.8	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)
			S.D.	1.0	1.5	1.6	1.7	1.9	1.9	2.0	2.0	1.7	1.9	21.8	23.8	23.7	34.3	51.1	67.5
	DCBS 80 ppm	24	Mean	16.4	17.8	18.2	18.6	18.6	19.3	19.5	18.8	18.5	18.2	21.5	23.4	22.8	34.2	50.3	65.9
			S.D.	1.0	1.5	1.7	1.6	2.0	1.8	1.6	1.5	1.7	1.7	2.1	2.0	2.0	3.3	4.1	4.4
	DCBS 600 ppm	24	Mean	16.2	17.6	17.8	18.5	18.7	19.3	19.2	18.9	18.8	18.7	22.7	24.8	23.7	33.9	50.2	65.0
			S.D.	0.9	1.2	1.3	1.5	1.7	1.6	1.8	1.7	1.9	1.8	1.9	2.7	2.0	4.5	5.1	5.5
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	15.1 **	16.2	16.6	17.6	17.9	18.1	18.3	17.9	17.7	17.9	20.5	22.7	23.0	31.7	47.9	63.1 §
			S.D.	1.0	1.6	1.5	1.4	1.6	1.5	1.7	1.5	1.6	1.5	1.9	1.8	1.5	3.7	3.8	5.4
F1	Control	24	Mean	13.0	17.5	18.9	20.1	20.8	20.9	21.3	21.1	20.4	20.7	(23)	(23)	(23)	(22)	(22)	(22)
			S.D.	1.1	1.6	1.7	1.8	2.3	2.3	2.8	2.3	2.6	2.3	23.5	26.7	24.7	30.4	48.2	62.6
	DCBS 80 ppm	24	Mean	13.5	17.5	19.0	19.9	20.6	21.2	21.0	20.9	20.3	20.7	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)
			S.D.	0.9	1.4	1.6	1.7	1.9	2.3	2.1	2.2	2.1	1.9	23.4	25.6	24.7	30.1	47.9	59.9
	DCBS 600 ppm	24	Mean	13.2	17.6	18.9	19.4	20.5	20.6	20.8	21.1	20.4	21.0	(22)	(22)	(22)	(21)	(21)	(21)
			S.D.	1.2	1.5	1.7	1.9	2.1	2.2	2.3	2.1	1.7	1.9	23.4	25.3	24.2	28.7	46.2	59.7
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	13.0	17.7	19.1	19.8	20.7	21.1	21.0	21.0	20.7	21.1	(23)	(23)	(23)	(23)	(23)	(23)
			S.D.	1.2	1.4	1.5	1.8	1.7	2.1	1.9	1.9	1.8	2.0	23.8	25.6	25.5	26.8	43.7	58.9
														2.5	3.3	2.6	5.2	6.4	8.7

Values in parentheses are the number of animals examined.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.§: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Mann-Whitney U-test.

Table 9 Test substance intake of F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals	Pre-mating period										Breeding period			All the periods			
			Test substance intake (mg/kg/day) in treatment week										12	13	14	Min	-	Max	Mean
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10							
F0	DCBS 80 ppm	24	8.0	7.4	6.4	5.8	5.4	5.1	4.8	4.6	4.5	4.3	4.0	3.9	3.8	3.8	-	8.0	5.2
	DCBS 600 ppm	24	60	55	49	44	40	38	35	34	33	32	30	29	28	28	-	60	39
	DCBS 4500 ppm	24	443	399	354	323	299	285	270	257	251	243	227	220	216	216	-	443	291
F1	DCBS 80 ppm	24	9.5	8.9	7.9	7.0	6.3	5.7	5.2	4.9	4.7	4.5	4.1	3.9	3.9	3.9	-	9.5	5.9
	DCBS 600 ppm	24	71	67	59	52	47	42	40	37	35	33	31	30	29	29	-	71	44
	DCBS 4500 ppm	24	534	502	449	392	355	322	296	277	260	249	234	219	219	219	-	534	331

Table 10 Test substance intake of F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals	Pre-mating period										Breeding period						All the periods			
			Test substance intake (mg/kg/day)										Gestation days			Lactation days						
			Treatment week																			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	0-7	7-14	14-20	0-7	7-14	14-21	Min	-	Max	Mean
F0	DCBS 80 ppm	24	8.3	7.9	7.2	6.7	6.3	6.1	5.9	5.5	5.3	5.1	5.3	5.3	4.3	8.0	11.5	16.3	4.3	-	16.3	7.2
	DCBS 600 ppm	24	62	59	53	51	48	46	44	42	41	39	42	41	33	59	86	121	33	-	121	54
	DCBS 4500 ppm	24	460	438	402	387	367	350	337	322	310	307	315	315	266	459	681	942	266	-	942	416
F1	DCBS 80 ppm	24	9.9	9.3	8.3	7.6	7.0	6.6	6.2	5.9	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5	6.7	10.5	14.3	4.5	-	14.3	7.4
	DCBS 600 ppm	24	73	70	62	56	53	49	46	45	42	41	41	41	33	49	77	107	33	-	107	55
	DCBS 4500 ppm	24	538	526	479	431	404	377	352	336	320	315	315	309	260	348	563	794	260	-	794	417

Test substance intake of females during the lactation period was expressed as the total amounts of the test substance by maternal animals and their offspring.

Table 11 Vaginal estrous cycles in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals	Estrous cyclicity		
			Normality		
			Incidence (%) ^a	Length (days)	
F0	Control	24	24/24	Mean	4.05
			(100)	S.D.	0.16
	DCBS 80 ppm	24	24/24	Mean	4.01
			(100)	S.D.	0.06
	DCBS 600 ppm	24	24/24	Mean	4.04
			(100)	S.D.	0.15
	DCBS 4500 ppm	24	24/24	Mean	4.01
			(100)	S.D.	0.06
F1	Control	24	23/24	Mean	4.21
			(95.8)	S.D.	0.34
	DCBS 80 ppm	24	24/24	Mean	4.05
			(100)	S.D.	0.21
	DCBS 600 ppm	24	23/24	Mean	4.25
			(95.8)	S.D.	1.08
	DCBS 4500 ppm	24	24/24	Mean	4.07
			(100)	S.D.	0.24

a: Incidence of females with the normal estrous cycle (%) = (number of females cycling normally/number of females examined) x 100.
The normal estrous cycle is defined as having a mean cycle length between 4.0 and 6.0 days.

Table 12 Reproductive findings in F0 and F1 parental rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Copulation index		Fertility index		Gestation		Pre- coital	Gesta- tion	Number of	Delivery	Number of	Sex	Viability index (%) ^b on			
		Male	Female	Male	Female	index								postnatal day			
		(Inci- dence, %)	(Inci- dence, %)	(Inci- dence, %)	(Inci- dence, %)	(Inci- dence, %)								0	4	21	
F1 pup data																	
F0	Control	24/24 (100)	24/24 (100)	22/24 (91.7)	22/24 (91.7)	22/22 (100)	Mean S.D.	2.4 1.2	22.1 0.4	13.5 2.1	94.9 6.0	12.8 2.1	0.528	99.0 2.6	98.7 3.6	100.0 0.0	
	DCBS 80 ppm	23/23 (100)	24/24 (100)	23/23 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	Mean S.D.	2.8 1.1	22.2 0.4	13.9 1.4	94.9 6.3	13.2 1.6	0.554	99.3 2.4	98.2 3.1	99.0 3.5	
	DCBS 600 ppm	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	Mean S.D.	2.4 1.0	22.0 0.3	14.6 1.3	94.3 5.4	13.8 1.5	0.506	99.7 1.4	96.6 9.5	99.5 2.6	
	DCBS 4500 ppm	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	Mean S.D.	2.4 1.1	22.1 0.3	13.2 1.5	94.8 4.7	12.5 1.7	0.525	99.0 2.8	97.6 4.7	99.5 2.6	
F2 pup data																	
F1	Control	24/24 (100)	24/24 (100)	23/24 (95.8)	23/24 (95.8)	23/23 (100)	Mean S.D.	2.7 1.0	22.3 0.4	14.1 3.2	90.4 13.4	12.7 3.6	0.488	98.7 2.9	95.9 9.2	100.0 0.0	
	DCBS 80 ppm	24/24 (100)	24/24 (100)	22/24 (91.7)	22/24 (91.7)	22/22 (100)	Mean S.D.	2.6 1.4	22.2 0.4	13.5 3.7	92.9 5.7	12.6 3.7	0.516	99.7 1.2	94.2 17.5	100.0 0.0	
	DCBS 600 ppm	22/24 (91.7)	24/24 (100)	20/22 (90.9)	22/24 (91.7)	21/22 (95.5)	Mean S.D.	2.6 1.2	22.1 0.4	13.0 4.2	88.9 21.0	12.0 4.2	0.557	98.3 4.5	93.1 13.0	97.0 8.8	
	DCBS 4500 ppm	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	Mean S.D.	2.8 1.7	22.1 0.3	14.3 2.1	91.3 11.2	13.0 2.4	0.522	95.9 5.7	88.4 22.7	97.7 6.8	

Copulation index (%) = (number of animals with successful copulation/number of animals paired) x 100.

Fertility index (%) = (number of animals that impregnated a female or were pregnant/number of animals with successful copulation) x 100.

Gestation index (%) = (number of females that delivered live pups/number of pregnant females) x 100.

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

Sex ratio = total number of male pups/total number of pups.

Viability index on postnatal day 0 (%) = (number of live pups on postnatal day 0/number of pups delivered) x 100.

Viability index on postnatal day 4 (%) = (number of live pups on postnatal day 4/number of live pups on postnatal day 0) x 100.

Viability index on postnatal day 21 (%) = (number of live pups on postnatal day 21/number of live pups selected for use on postnatal day 4) x 100.

a and b: The litter is the unit evaluated.

Values in parentheses are the number of animals examined.

Table 13 Sperm number and motility in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Number of testis sperms		Number of epididymal sperms		% Motile	% Pro-gressive	Swimming speed			Swimming pattern		STR	LIN
				10 ⁶ /testis	10 ⁶ /g testis	10 ⁶ /cauda	10 ⁶ /g cauda			VAP	VSL	VCL	ALH	BCF		
F0	Control	24	Mean	184.1	111.4	268.5	856.4	88.1	70.9	159.6	112.1	365.7	20.1	27.9	69.3	30.4
			S.D.	29.3	13.2	47.6	94.4	9.3	17.4	20.8	22.5	53.4	1.1	1.5	6.6	2.8
	DCBS 80 ppm	23	Mean	187.7	110.7	276.2	838.9	92.6	77.3	159.8	114.1	370.1	19.9	27.4	70.7	30.7
			S.D.	28.3	15.7	40.3	99.4	8.2	15.3	19.2	20.0	42.5	1.1	1.5	5.7	3.0
	DCBS 600 ppm	24	Mean	184.2	110.6	269.9	850.3	93.2	77.4	162.7	116.1	372.3	20.0	27.6	71.0	31.3
			S.D.	32.7	17.1	56.8	122.1	5.9	12.1	22.0	19.3	49.8	1.3	2.2	4.3	2.5
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	180.8	106.1	263.7	844.2	89.4	70.5	156.8	110.5	358.4	19.9	28.3	69.5	30.6
			S.D.	35.4	18.8	62.8	191.3	10.2	22.2	25.3	29.2	56.3	1.0	2.3	8.6	4.0
	Control	24	Mean	194.5	115.3	273.6	849.9	92.3	81.8	175.2	126.9	399.5	21.3	26.4	72.5	32.0
			S.D.	23.0	9.5	40.0	69.4	5.0	8.1	9.8	10.2	19.8	0.9	1.6	3.3	2.1
	DCBS 80 ppm	24	Mean	181.1	108.4	254.0	821.5	92.9	81.8	171.7	123.9	391.5	20.9	26.8	72.1	31.9
			S.D.	21.3	14.3	40.4	106.8	4.0	4.9	11.2	10.3	28.6	0.8	1.4	2.7	2.0
F1	DCBS 600 ppm	24	Mean	186.3	111.1	256.2	827.2	93.3	83.9	172.4	126.0	395.1	20.8	26.1	73.3	32.1
			S.D.	22.5	11.3	46.0	93.3	5.6	6.4	11.4	10.5	28.6	0.8	1.6	2.9	1.8
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	201.0	113.6	250.3	807.0	93.0	82.7	171.3	125.7	393.6	20.5 *	27.0	73.5	32.2
			S.D.	33.3	15.0	55.4	127.5	7.4	8.2	13.9	12.6	29.8	1.0	1.8	2.8	1.5

VAP: Mean path velocity (µm/sec).

VSL: Straight line average velocity (µm/sec).

VCL: Mean curvilinear velocity (µm/sec).

ALH: Mean lateral head displacement (µm).

BCF: Mean beat cross frequency (Hz).

STR: Mean straightness (%) = VSL/VAP x 100.

LIN: Mean linearity (%) = VSL/VCL x 100.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

Table 14 Abnormal sperm ratio in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

				Abnormal sperm ratio (%)												
Gener- ation	Group	Number of animals		Total	Head							Neck and middle piece			Tail	
					Tailless sperm	Small sized	Banana shaped	Hooked shaped	Truncated shaped	Amorphous shaped	Two heads	Flexion	Two necks	Enlarge- ment	Fragmen- tation	Two tails
F0	Control	24	Mean	1.1	1.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			S.D.	0.6	0.6	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	DCBS 80 ppm	23	Mean	1.2	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			S.D.	0.8	0.8	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	DCBS 600 ppm	24	Mean	2.4	2.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
			S.D.	3.5	3.5	0.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	2.0	1.8	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			S.D.	2.4	2.0	0.0	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F1	Control	24	Mean	1.4	1.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			S.D.	1.3	1.2	0.0	0.3	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	DCBS 80 ppm	24	Mean	1.1	0.9	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			S.D.	0.8	0.8	0.0	0.2	0.0	0.2	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	DCBS 600 ppm	24	Mean	1.2	1.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			S.D.	1.7	1.6	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	1.6	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			S.D.	1.9	1.8	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0

Table 15 Sexual development in F1 parental rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Male				Female			
		Number of animals		Age at preputial separation (days)	Body weight (g) on the day at preputial separation	Number of animals		Age at vaginal opening (days)	Body weight (g) on the day at vaginal opening
F1	Control	24	Mean	41.3	226.9	24	Mean	29.6	104.6
			S.D.	1.6	20.3		S.D.	1.0	9.4
	DCBS 80 ppm	24	Mean	41.4	226.5	24	Mean	30.0	109.1
			S.D.	1.6	18.5		S.D.	1.7	10.6
	DCBS 600 ppm	24	Mean	41.8	228.3	24	Mean	31.2 ^{\$§}	112.1 *
			S.D.	1.6	17.0		S.D.	1.7	13.8
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	42.8 **	229.6	24	Mean	31.1 ^{\$§}	112.3 *
			S.D.	1.5	17.5		S.D.	1.3	9.1

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

^{\$§}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 16 Locomotor activity count in F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals		Locomotor activity count						
				Determination time (minutes)						
				0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	0-60
F1	Control	10	Mean	206.0	76.8	26.3	14.3	5.3	0.8	329.5
			S.D.	58.9	40.7	25.0	30.6	16.8	2.2	126.7
	DCBS 80 ppm	10	Mean	248.8	63.1	34.2	9.6	11.0	1.6	368.3
			S.D.	78.8	35.7	32.6	14.3	19.7	5.1	146.2
	DCBS 600 ppm	10	Mean	208.7	78.9	58.1	52.2	12.0	14.7	424.6
			S.D.	111.6	63.7	71.3	89.1	28.2	31.6	230.1
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	204.6	72.2	20.9	11.5	1.0	0.0	310.2
			S.D.	154.5	86.4	20.1	17.0	2.5	0.0	236.3
			Mean							
			S.D.							
			Mean							
			S.D.							

Table 17 Locomotor activity count in F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals		Locomotor activity count						
				Determination time (minutes)						
				0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	0-60
F1	Control	10	Mean	168.3	55.7	23.6	10.1	1.8	0.5	260.0
			S.D.	66.1	42.3	27.4	20.6	5.7	1.6	115.6
	DCBS 80 ppm	10	Mean	212.0	59.3	34.8	19.7	11.2	0.0	337.0
			S.D.	121.3	46.5	75.6	54.4	35.4	0.0	297.9
	DCBS 600 ppm	10	Mean	220.2	74.3	25.7	9.1	4.5	0.8	334.6
			S.D.	103.7	48.9	32.7	26.1	11.7	2.5	181.6
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	203.1	52.6	19.7	14.5	6.6	0.0	296.5
			S.D.	109.8	42.2	21.8	34.9	20.9	0.0	173.4
			Mean							
			S.D.							
			Mean							
			S.D.							

Table 18 Data on learning tests in F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals		Time for maze trials (sec)				Number of errors for maze trials			
				Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
F1	Control	10	Mean	8.2	58.0	29.0	30.9	0.0	10.2	2.8	2.8
			S.D.	2.4	35.1	9.8	12.1	0.1	7.2	1.8	2.0
	DCBS 80 ppm	10	Mean	8.1	47.1	23.6	19.8	0.1	8.5	3.0	1.3
			S.D.	1.2	20.5	7.0	7.9	0.1	2.2	1.7	0.9
	DCBS 600 ppm	10	Mean	8.9	46.3	35.1	26.7	0.1	7.8	5.1	2.6
			S.D.	1.9	19.6	16.1	11.8	0.1	2.9	3.9	2.2
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	8.7	58.2	30.7	27.0	0.0	10.8	4.3	2.4
			S.D.	2.1	23.1	11.5	7.6	0.1	4.1	2.5	1.7
			Mean								
			S.D.								
			Mean								
			S.D.								

Day 1 : Used a straight channel.

Days 2-4 : Used a multiple T-maze.

Table 19 Data on learning tests in F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Time for maze trials (sec)				Number of errors for maze trials			
				Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
F1	Control	10	Mean	10.9	36.8	31.8	19.8	0.2	6.1	4.5	2.9
			S.D.	3.4	12.4	21.7	5.8	0.2	2.6	3.3	1.4
	DCBS 80 ppm	10	Mean	8.8	41.9	27.6	25.2	0.1	6.8	3.9	3.6
			S.D.	2.6	15.1	12.9	13.1	0.2	2.5	2.5	4.3
	DCBS 600 ppm	10	Mean	9.7	57.7 *	36.6	28.1	0.2	8.3	5.3	3.7
			S.D.	4.0	18.7	17.9	14.2	0.4	2.7	2.9	3.4
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	10.2	57.7 *	39.5	31.5	0.2	9.4 *	5.6	3.2
			S.D.	2.5	17.8	17.7	18.7	0.2	2.8	3.4	2.8

Day 1 : Used a straight channel.

Days 2-4 : Used a multiple T-maze.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

Table 20 Hematological findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		WBC 10 ² /μL	Differential count of WBC %						
					Neutrophil		Eosino- phil	Baso- phil	Mono- cyte	Lympho- cyte	Others
					Stab form	Seg- mented					
F0	Control	10	Mean	92	0.96	12.64	1.16	0.00	2.72	82.5	0.00
			S.D.	22	0.63	5.11	0.64	0.00	1.08	5.2	0.00
	DCBS 80 ppm	10	Mean	83	0.92	8.88	1.12	0.00	2.52	86.6	0.00
			S.D.	17	0.33	2.38	0.75	0.00	0.84	2.4	0.00
	DCBS 600 ppm	10	Mean	96	0.88	9.28	1.84	0.00	2.48	85.5	0.00
			S.D.	26	0.41	3.62	0.97	0.00	0.92	3.5	0.00
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	111	0.52	9.12	1.44	0.00	2.00	86.9 *	0.00
			S.D.	32	0.53	3.28	0.85	0.00	0.68	3.9	0.00
F1	Control	10	Mean	104	0.76	11.16	1.24	0.00	2.64	84.2	0.00
			S.D.	17	0.40	3.45	0.87	0.00	0.95	4.5	0.00
	DCBS 80 ppm	10	Mean	103	0.68	9.96	1.12	0.00	3.28	85.0	0.00
			S.D.	13	0.50	3.71	0.73	0.00	1.46	4.9	0.00
	DCBS 600 ppm	10	Mean	126	0.84	9.32	0.92	0.08	2.44	86.4	0.00
			S.D.	33	0.48	4.68	0.60	0.17	1.43	6.1	0.00
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	109	0.48	8.96	0.76	0.04	2.64	87.1	0.00
			S.D.	25	0.37	3.91	0.61	0.13	0.87	3.5	0.00

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

Table 21 Hematological findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		WBC 10 ² /μL	Differential count of WBC %						
					Neutrophil		Eosino- phil	Baso- phil	Mono- cyte	Lympho- cyte	Others
					Stab form	Seg- mented					
F0	Control	10	Mean	87	1.56	20.68	2.20	0.04	4.44	71.1	0.00
			S.D.	19	0.91	6.78	1.44	0.13	1.42	7.8	0.00
	DCBS 80 ppm	10	Mean	74	1.72	21.40	1.44	0.00	3.48	72.0	0.00
			S.D.	17	0.92	5.71	0.95	0.00	1.46	6.2	0.00
	DCBS 600 ppm	10	Mean	98	1.24	22.08	1.24	0.00	3.44	72.0	0.00
			S.D.	21	0.74	8.59	0.61	0.00	2.16	10.1	0.00
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	76	1.68	21.92	1.60	0.00	3.52	71.3	0.00
			S.D.	17	0.96	10.81	0.82	0.00	1.63	11.8	0.00
F1	Control	10	Mean	98	1.48	19.52	1.00	0.04	3.40	74.6	0.00
			S.D.	20	0.50	5.76	0.43	0.13	2.02	5.9	0.00
	DCBS 80 ppm	10	Mean	90	1.12	19.72	0.72	0.00	2.60	75.8	0.00
			S.D.	17	0.65	8.13	0.59	0.00	1.10	8.2	0.00
	DCBS 600 ppm	10	Mean	96	1.28	13.48	0.48	0.04	1.88	82.8 *	0.00
			S.D.	26	0.73	6.32	0.56	0.13	1.07	6.7	0.00
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	98	1.24	17.40	0.84	0.00	3.04	77.5	0.00
			S.D.	24	0.58	4.58	0.61	0.00	2.18	6.0	0.00

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

Table 22 Blood chemical findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	Globulin g/dL
F0	Control	10	Mean	6.27	2.43	3.84
			S.D.	0.32	0.13	0.31
	DCBS 80 ppm	10	Mean	6.31	2.43	3.88
			S.D.	0.21	0.09	0.18
	DCBS 600 ppm	10	Mean	6.33	2.40	3.93
			S.D.	0.31	0.12	0.28
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	6.54	2.49	4.05
			S.D.	0.28	0.07	0.24
F1	Control	10	Mean	6.07	2.29	3.78
			S.D.	0.26	0.12	0.24
	DCBS 80 ppm	10	Mean	6.15	2.31	3.84
			S.D.	0.31	0.11	0.25
	DCBS 600 ppm	10	Mean	6.26	2.31	3.95
			S.D.	0.23	0.13	0.29
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	6.16	2.31	3.85
			S.D.	0.26	0.07	0.27

Table 23 Blood chemical findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	Globulin g/dL
F0	Control	10	Mean	6.45	2.71	3.74
			S.D.	0.27	0.14	0.25
	DCBS 80 ppm	10	Mean	6.80	2.78	4.02
			S.D.	0.43	0.19	0.29
	DCBS 600 ppm	10	Mean	6.28	2.60	3.68
			S.D.	0.30	0.17	0.22
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	6.45	2.65	3.80
			S.D.	0.39	0.16	0.25
F1	Control	10	Mean	6.36	2.66	3.70
			S.D.	0.33	0.13	0.25
	DCBS 80 ppm	10	Mean	6.34	2.61	3.73
			S.D.	0.41	0.14	0.27
	DCBS 600 ppm	10	Mean	6.23	2.59	3.64
			S.D.	0.37	0.20	0.25
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	6.39	2.63	3.76
			S.D.	0.33	0.15	0.23

Table 24 Serum hormone levels in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals		Testosterone (ng/mL)	DHT ^a (pg/mL)	LH ^b (ng/mL)	FSH (ng/mL)
F0	Control	8	Mean	1.32	80.9	1.03	8.87
			S.D.	0.90	41.4	0.10	1.61
	DCBS 80 ppm	8	Mean	1.38	82.2	0.83	9.55
			S.D.	0.97	32.0	0.72	2.16
	DCBS 600 ppm	8	Mean	1.01	69.1	1.26	9.43
			S.D.	0.29	28.3	0.38	1.40
	DCBS 4500 ppm	8	Mean	1.07	56.4	1.08	9.31
			S.D.	0.92	34.9	0.54	0.97
F1	Control	8	Mean	0.40	39.2	1.38	7.68
			S.D.	0.13	26.7	0.32	1.46
	DCBS 80 ppm	8	Mean	0.99 [§]	49.7	1.23	7.05
			S.D.	0.70	14.6	0.56	1.02
	DCBS 600 ppm	8	Mean	0.89	48.1	1.72 [§]	6.92
			S.D.	0.63	21.1	0.12	1.41
	DCBS 4500 ppm	8	Mean	0.72	41.9	1.58	7.84
			S.D.	0.43	25.6	0.34	1.53

a: The actual measurement of DHT was below the lower limit of quantification (<25.0 pg/mL) in one F1 animal each in the control and 4500 ppm groups.

b: The actual measurement of LH was below the lower limit of quantification (<0.80 ng/mL) in three F0 and one F1 animals in the 80 ppm group and one F0 animal in the 4500 ppm group.

[§]: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Mann-Whitney U-test.

Table 25 Serum hormone levels in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Estradiol (pg/mL)	Progesterone (ng/mL)	LH ^a (ng/mL)	FSH (ng/mL)
F0	Control	8	Mean	80.5	5.17	1.30	5.75
			S.D.	15.7	3.59	0.22	0.99
	DCBS 80 ppm	8	Mean	66.7	8.49	1.13	6.29
			S.D.	16.2	4.37	0.27	1.14
	DCBS 600 ppm	8	Mean	68.7	8.08	1.35	5.99
			S.D.	16.0	4.70	0.20	1.06
	DCBS 4500 ppm	8	Mean	64.0	9.88	1.15	5.60
			S.D.	12.3	4.20	0.49	0.86
F1	Control	8	Mean	73.8	6.42	1.45	3.12
			S.D.	25.3	2.84	0.26	0.28
	DCBS 80 ppm	8	Mean	61.9	8.95	1.34	3.63
			S.D.	17.2	3.55	0.59	1.38
	DCBS 600 ppm	8	Mean	59.7	7.20	1.52	3.91
			S.D.	21.5	4.66	0.24	1.32
	DCBS 4500 ppm	8	Mean	63.5	8.59	1.55	4.50
			S.D.	26.7	5.85	0.42	1.50

a: The actual measurement of LH was below the lower limit of quantification (<0.80 ng/mL) in one F1 animal in the 80 ppm group and one F0 animal in the 4500 ppm group.

Table 26 Autopsy findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	DCBS (ppm)															
		Control				80				600				4500			
		A	B	C	T	A	B	C	T	A	B	C	T	A	B	C	T
F0	Number of animals examined	22	2	0	24	23	0	1	24	24	0	0	24	24	0	0	24
	Number of animals with abnormal findings	0	0	-	0	0	-	1	1	3	-	-	3	1	-	-	1
	Findings ^a																
	Incisor: Malocclusion	0	0	-	0	0	-	1	1	1	-	-	1	0	-	-	0
	Nasal bone: Fracture	0	0	-	0	0	-	1	1	0	-	-	0	0	-	-	0
	Stomach, duodenum, jejunum, ileum and cecum: Retention gas	0	0	-	0	0	-	1	1	0	-	-	0	0	-	-	0
	Ileum: White mass, serosa	0	0	-	0	0	-	0	0	1	-	-	1	0	-	-	0
	Thickening, mucosa	0	0	-	0	0	-	0	0	1	-	-	1	0	-	-	0
	Mesenteric lymph node: Swelling	0	0	-	0	0	-	0	0	1	-	-	1	0	-	-	0
	Testis: Atrophy	0	0	-	0	0	-	0	0	0	-	-	0	1	-	-	1
	Epididymis: Atrophy	0	0	-	0	0	-	0	0	0	-	-	0	1	-	-	1
F1	Number of animals examined	23	1	0	24	22	2	0	24	20	4	0	24	24	0	0	24
	Number of animals with abnormal findings	2	1	-	3	4	0	-	4	1	0	-	1	6	-	-	6
	Findings ^a																
	Incisor: Malocclusion	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	1	-	-	1
	Ileum: Diverticulum	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	2	-	-	2
	Kidney : Dilatation, renal pelvis	1	1	-	2	3	0	-	3	1	0	-	1	2	-	-	2
	Fine white granule, renal pelvis	0	0	-	0	1	0	-	1	0	0	-	0	0	-	-	0
	Seminal vesicle : Small size	0	0	-	0	1	0	-	1	0	0	-	0	1	-	-	1
	Testis: Atrophy	1	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	-	-	0
	Epididymis: Atrophy	1	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	-	-	0

Statistical analyses were made based on the total number of animals examined.

Fate: A, animals that impregnated a female; B, animals that unsuccessfully mated or did not impregnate a female; C, animals that were euthanized during the study; T, total (A+B+C).

a: Values represent the number of animals that showed abnormal findings.

-: Not applicable.

Table 27 Autopsy findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	DCBS (ppm)															
		Control				80				600				4500			
		A	B	C	T	A	B	C	T	A	B	C	T	A	B	C	T
F0	Number of animals examined	22	2	0	24	24	0	0	24	24	0	0	24	24	0	0	24
	Number of animals with abnormal findings	4	2	-	6	0	-	-	0 *	0	-	-	0 *	1	-	-	1
	Findings ^a																
	Skin: Subcutaneous yellowish/grayish white mass	1	0	-	1	0	-	-	0	0	-	-	0	1	-	-	1
	Incisor: Malocclusion/fracture	3	0	-	3	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	0
	Nasal bone: Deformity	1	0	-	1	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	0
	Ileum: Diverticulum	0	1	-	1	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	0
	Uterine horn: Retention, yellowish white mucous fluid	0	1	-	1	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	0
	Vagina: Atresia	0	2	-	2	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	0
F1	Number of animals examined	22	1	1	24	22	2	0	24	21	3	0	24	23	1	0	24
	Number of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	-	0	1	0	-	1	4	1	-	5 *
	Findings ^a																
	Incisor: Malocclusion	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	3	0	-	3
	Cerebrum: Dilatation, ventricle	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	1	-	1
	Thyroid: Aplasia	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	1	0	-	1
	Thymus: Atrophy	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	1	0	-	1
	Kidney: Dilatation, renal pelvis	0	0	0	0	0	0	-	0	1	0	-	1	0	0	-	0
	Ureter: Dilatation	0	0	0	0	0	0	-	0	1	0	-	1	0	0	-	0

Statistical analyses were made based on the total number of animals examined.

Fate: A, animals that had weanlings; B, animals that were not pregnant and that did not produce viable pups or weanlings; C, animals that died during the study; T, total (A+B+C).

a: Values represent the number of animals that showed abnormal findings.

-: Not applicable.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Fisher's exact probability test.

Table 28 Absolute and relative organ weights in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Body weight	Brain		Pituitary gland		Thyroid ^a		Thymus		Liver		Kidney ^a		Spleen	
					g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
F0	Control	24	Mean	624.4	2.25	0.366	12.8	2.07	24.0	3.85	300	48.2	20.45	3.25	3.64	0.585	882	142
			S.D.	76.0	0.08	0.041	1.3	0.22	4.0	0.60	73	11.3	4.34	0.33	0.42	0.043	158	20
	DCBS 80 ppm	23	Mean	612.5	2.28	0.375	13.1	2.16	23.7	3.87	289	47.2	19.76	3.22	3.64	0.595	835	137
			S.D.	61.0	0.10	0.034	1.4	0.22	4.3	0.59	55	8.2	2.94	0.25	0.41	0.044	143	20
	DCBS 600 ppm	24	Mean	603.4	2.25	0.376	12.9	2.15	24.4	4.08	318	52.9	19.76	3.27	3.57	0.593	846	140
			S.D.	51.2	0.07	0.031	1.3	0.21	4.1	0.81	67	11.1	2.09	0.18	0.29	0.035	167	24
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	575.4 ^{\$}	2.25	0.392 *	12.4	2.15	26.6	4.63 **	272	47.2	19.96	3.47 ^{\$}	3.69	0.641 **	748 **	131
			S.D.	42.3	0.08	0.030	1.2	0.19	5.2	0.86	49	6.8	2.21	0.26	0.36	0.040	112	21
F1	Control	24	Mean	630.7	2.26	0.363	13.6	2.17	24.9	3.95	346	54.8	20.80	3.28	3.70	0.586	909	145
			S.D.	74.7	0.10	0.038	1.4	0.23	4.9	0.66	116	17.0	3.73	0.29	0.52	0.041	129	16
	DCBS 80 ppm	24	Mean	605.1	2.29	0.380	13.9	2.30	23.3	3.86	269 ^{\$}	44.5 ^{\$}	19.69	3.25	3.66	0.606	845	139
			S.D.	47.7	0.06	0.028	1.3	0.25	4.7	0.78	54	8.9	2.32	0.19	0.23	0.042	141	18
	DCBS 600 ppm	24	Mean	614.2	2.26	0.370	13.9	2.27	23.8	3.88	331	53.9	21.19	3.46	3.69	0.602	847	138
			S.D.	52.5	0.06	0.030	1.1	0.17	4.5	0.69	83	12.7	2.06	0.28	0.36	0.047	124	17
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	622.6	2.21 ^{\$}	0.356	14.0	2.26	24.6	3.95	316	50.9	22.82 ^{\$}	3.65 **	3.91	0.629 **	869	139
			S.D.	51.8	0.09	0.027	1.6	0.26	4.9	0.67	62	9.8	3.37	0.28	0.43	0.044	162	17

(to be continued)

a: Values represent the total weights of the organs of both sides.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

^{\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Mann-Whitney U-test.

Table 28 (continued) Absolute and relative organ weights in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Adrenal ^a		Testis ^a		Epididymis ^a		Seminal vesicle		Prostate	
				mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %
F0	Control	24	Mean	58.0	9.3	3.54	0.576	1350	219	2.31	0.376	899	145
			S.D.	9.5	1.3	0.24	0.083	105	26	0.25	0.062	189	32
	DCBS 80 ppm	23	Mean	57.9	9.5	3.62	0.598	1379	228	2.28	0.376	910	149
			S.D.	7.7	1.1	0.20	0.075	74	28	0.24	0.060	150	20
	DCBS 600 ppm	24	Mean	57.7	9.6	3.57	0.594	1354	225	2.27	0.376	853	142
			S.D.	7.4	1.2	0.24	0.048	113	17	0.29	0.041	234	37
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	51.0 **	8.9	3.65	0.637 **	1330	232	2.15	0.375	769	134
			S.D.	6.1	1.0	0.31	0.068	115	21	0.21	0.034	165	26
F1	Control	24	Mean	60.5	9.6	3.60	0.575	1348	215	2.30	0.368	838	133
			S.D.	9.8	1.5	0.35	0.062	138	24	0.23	0.047	174	24
	DCBS 80 ppm	24	Mean	60.3	10.0	3.61	0.601	1342	223	2.19	0.364	812	134
			S.D.	7.1	1.0	0.27	0.073	67	21	0.28	0.054	181	28
	DCBS 600 ppm	24	Mean	61.8	10.1	3.60	0.589	1327	217	2.21	0.362	822	134
			S.D.	7.2	1.3	0.27	0.066	111	22	0.22	0.039	190	29
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	61.3	9.8	3.78	0.610	1346	217	2.07 **	0.333 *	784	127
			S.D.	13.1	2.0	0.32	0.062	118	19	0.26	0.045	168	31

a: Values represent the total weights of the organs of both sides.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

Table 29 Absolute and relative organ weights in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Body weight	Brain		Pituitary gland		Thyroid ^a		Thymus		Liver		Kidney ^a		Spleen	
				g	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
F0	Control	22	Mean	305.9	2.04	0.670	13.8	4.51	18.8	6.19	237	77.0	13.73	4.48	2.13	0.696	632	207
			S.D.	28.5	0.10	0.050	1.8	0.47	4.4	1.57	71	21.6	2.51	0.67	0.29	0.063	97	27
	DCBS 80 ppm	24	Mean	311.6	2.12 **	0.681	15.2 *	4.87	17.7	5.67	209	67.2	13.83	4.43	2.20	0.707	582	187 *
			S.D.	17.1	0.09	0.046	1.9	0.63	2.2	0.71	55	17.5	1.73	0.44	0.16	0.058	78	26
	DCBS 600 ppm	24	Mean	313.7	2.12 **	0.676	14.7	4.70	16.9	5.40	242	77.7	13.86	4.41	2.29	0.731	583	186 *
			S.D.	17.8	0.07	0.042	2.2	0.66	3.1	0.92	57	19.8	1.84	0.47	0.23	0.068	77	22
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	288.5 ^{\$}	2.07	0.720 **	13.6	4.71	17.5	6.10	197	68.5	13.67	4.74	2.27	0.786 **	560 *	194
			S.D.	16.2	0.07	0.045	1.8	0.60	2.2	0.86	59	20.8	1.48	0.44	0.19	0.057	79	27
	Control	22	Mean	331.9	2.08	0.632	15.9	4.83	19.0	5.72	251	75.3	14.55	4.39	2.37	0.713	632	191
			S.D.	32.5	0.08	0.056	2.0	0.73	3.9	0.98	69	18.4	1.66	0.28	0.30	0.046	73	18
	DCBS 80 ppm	22	Mean	331.2	2.17 **	0.658	16.1	4.90	18.2	5.51	212	64.1	14.18	4.28	2.39	0.723	599	181
			S.D.	28.5	0.08	0.056	2.4	0.79	2.7	0.70	47	14.2	2.14	0.49	0.22	0.040	63	15
	DCBS 600 ppm	21	Mean	331.3	2.15 *	0.651	15.8	4.78	17.7	5.35	261	79.2	14.32	4.33	2.40	0.726	609	184
			S.D.	23.1	0.08	0.043	1.8	0.52	3.5	1.08	65	20.2	1.49	0.41	0.21	0.063	80	19
	DCBS 4500 ppm	23	Mean	330.2	2.08	0.633	16.1	4.89	19.4	5.89	211	64.0	15.83	4.81 ^{\$\$}	2.53	0.771 ^{\$\$}	639	194
			S.D.	30.8	0.08	0.060	1.9	0.66	4.1	1.15	63	18.7	2.11	0.59	0.26	0.080	115	37

(to be continued)

a: Values represent the total weights of the organs of both sides.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

^{\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Mann-Whitney U-test.

^{\$\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 29 (continued) Absolute and relative organ weights in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Adrenal ^a		Ovary ^a		Uterus	
				mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
F0	Control	22	Mean	66.8	21.8	100.2	32.8	957	313
			S.D.	9.4	2.3	15.8	4.4	189	56
	DCBS 80 ppm	24	Mean	65.9	21.2	95.4	30.7	962	310
			S.D.	6.1	2.1	11.6	3.9	186	65
	DCBS 600 ppm	24	Mean	68.3	21.8	101.1	32.3	975	311
			S.D.	8.6	2.6	9.1	3.1	198	63
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	69.6	24.1 **	91.6	31.8	1024	357
			S.D.	8.1	2.7	12.4	4.1	203	76
F1	Control	22	Mean	70.0	21.2	110.6	33.4	927	280
			S.D.	9.7	3.2	13.0	2.9	191	54
	DCBS 80 ppm	22	Mean	73.5	22.2	109.1	33.0	928	283
			S.D.	10.9	3.1	16.3	4.5	128	48
	DCBS 600 ppm	21	Mean	73.4	22.2	108.5	32.8	976	295
			S.D.	9.3	3.0	12.5	3.2	185	52
	DCBS 4500 ppm	23	Mean	77.5 *	23.6 *	108.2	32.8	949	288
			S.D.	8.9	3.2	13.4	3.3	192	52

a: Values represent the total weights of the organs of both sides.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

Table 30 Histopathological findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	DCBS (ppm)											
		Control			80			600			4500		
		A	B	T	A	B	T	A	B	T	A	B	T
F0	Number of animals examined	22	2	24	0	0	0	0	0	0	24	0	24
	Findings in organs/tissues examined ^{a,b,c}												
	Liver: Microgranuloma	4	2	6	-	-	-	-	-	-	5	-	5
	Kidney: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	12	2	14	-	-	-	-	-	-	20	-	20
	Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	12	2	14	-	-	-	-	-	-	20	-	20
	Regeneration, tubular epithelium	5	0	5	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	Cast, hyaline	2	0	2	-	-	-	-	-	-	2	-	2
	Cellular infiltration, inflammatory cell, renal pelvic mucosa	0	1	1	-	-	-	-	-	-	0	-	0
	Cyst	2	0	2	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	Testis: Atrophy, seminiferous tubule	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	Epididymis: Decrease, sperm	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	Cell debris, lumen	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	Prostate: Cellular infiltration, inflammatory cell	15	0	15	-	-	-	-	-	-	17	-	17
	Pituitary gland: Cyst, pars distalis	1	0	1	-	-	-	-	-	-	0	-	0
	Cyst, pars intermedia	1	0	1	-	-	-	-	-	-	0	-	0
	Tubular hyperplasia, pars intermedia	1	0	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	Findings in organs/tissues in which abnormal findings were grossly observed ^{a,d}												
	Ileum: Cyst, squamous cell	-	-	-	-	-	-	1(2)	-	1(2)	-	-	-
	Cellular infiltration, inflammatory cell	-	-	-	-	-	-	1(2)	-	1(2)	-	-	-
	Mesenteric lymph node: Hyperplasia, lymphoid	-	-	-	-	-	-	1(1)	-	1(1)	-	-	-

(to be continued)

Fate: A, animals that impregnated a female; B, animals that did not impregnate a female; T, total (A+B).

a: Values represent the number of animals that showed abnormal findings.

b: Organs/tissues examined were the liver, kidneys, thymus, thyroids, spleen, adrenals, bone marrow (femur), mesenteric lymph node, Peyer's patch, testis, epididymis, seminal vesicles, coagulating glands, prostate, mammary gland and pituitary gland.

c: Statistical analyses were made between the control and 4500 ppm groups based on the total number of animals examined.

d: Values in parentheses are the number of animals examined.

-: Not applicable.

Table 30 (continued) Histopathological findings in F0 and F1 parental male rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	DCBS (ppm)											
		Control			80			600			4500		
		A	B	T	A	B	T	A	B	T	A	B	T
F1	Number of animals examined	23	1	24	0	2	2	0	4	4	24	0	24
	Findings in organs/tissues examined ^{a,b,c}												
	Liver: Microgranuloma	8	0	8	-	1	1	-	3	3	7	-	7
	Kidney: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	20	0	20	-	1	1	-	2	2	24	-	24
	Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	20	0	20	-	1	1	-	2	2	24	-	24
	Regeneration, tubular epithelium	6	1	7	-	0	0	-	1	1	8	-	8
	Cast, hyaline	4	0	4	-	0	0	-	0	0	5	-	5
	Mineralization, papilla	0	0	0	-	0	0	-	0	0	1	-	1
	Dilatation, renal pelvis	1	1	2	-	0	0	-	0	0	2	-	2
	Testis: Atrophy, seminiferous tubule	1	0	1	-	0	0	-	0	0	0	-	0
	Epididymis: Decrease, sperm	1	0	1	-	0	0	-	0	0	0	-	0
	Cell debris, lumen	1	0	1	-	0	0	-	0	0	0	-	0
	Prostate: Cellular infiltration, inflammatory cell	13	0	13	-	2	2	-	1	1	12	-	12
	Pituitary gland: Cyst, pars distalis	0	0	0	-	0	0	-	1	1	1	-	1
	Tubular hyperplasia, pars intermedia	0	0	0	-	0	0	-	0	0	1	-	1

Fate: A, animals that impregnated a female; B, animals that unsuccessfully mated or did not impregnate a female; T, total (A+B).

a: Values represent the number of animals that showed abnormal findings.

b: Organs/tissues examined were the liver, kidneys, thymus, thyroids, spleen, adrenals, bone marrow (femur), mesenteric lymph node, Peyer's patch, testis, epididymis, seminal vesicles, coagulating glands, prostate, mammary gland and pituitary gland.

c: Statistical analyses were made between the control and 4500 ppm groups based on the total number of animals examined.

-: Not applicable.

Table 31 Histopathological findings in F0 and F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	DCBS (ppm)															
		Control				80				600				4500			
		A	B	C	T	A	B	C	T	A	B	C	T	A	B	C	T
F0	Number of animals examined	22	2	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	24
	Findings in organs/tissues examined ^{a,b,c}																
	Liver: Microgranuloma	5	0	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	7
	Kidney: Regeneration, tubular epithelium	1	0	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
	Cellular infiltration, inflammatory cell, renal pelvic mucosa	1	0	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0
	Mineralization, renal pelvic mucosa	0	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0
	Mineralization, cortex	0	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
	Uterine horn: Cellular infiltration, inflammatory cell	0	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0
	Vagina: Atresia	0	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0
	Pituitary gland: Cyst, pars intermedia	1	0	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0
	Tubular hyperplasia, pars intermedia	1	0	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
	Mammary gland: Adenocarcinoma	1	0	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
F1	Number of animals examined	21	2	1	24 ^e	0	2	0	2	0	4	0	4	23	1	0	24
	Findings in organs/tissues examined ^{a,b,c}																
	Liver: Microgranuloma	11	1	0	12	-	1	-	1	-	3	-	3	11	1	-	12
	Kidney: Regeneration, tubular epithelium	1	0	-	1	-	0	-	0	-	1	-	1	0	0	-	0
	Dilatation, tubule	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	1	0	-	1
	Cellular infiltration, inflammatory cell, renal pelvic mucosa	1	0	-	1	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	-	0
	Cellular infiltration, inflammatory cell, cortex	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	1	0	-	1
	Mineralization, cortico-medullary junction	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	1	0	-	1
	Cast, hyaline	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	1	0	-	1
	Cyst	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	1	0	-	1
	Dilatation, renal pelvis	0	0	-	0	-	0	-	0	-	1	-	1	0	0	-	0
	Thymus: Atrophy, cortex	0	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	1	0	-	1
	Pituitary gland: Cyst, pars intermedia	1	0	0	1	-	0	-	0	-	1	-	1	0	0	-	0
	Tubular hyperplasia, pars intermedia	1	0	0	1	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	-	0
	Findings in organs/tissues in which abnormal findings were grossly observed ^{a,d}																
	Cerebrum: Dilatation, ventricle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(1)	-	1(1)

Fate: A, animals that had weanlings; B, animals that were not pregnant, did not produce viable pups or weanlings, or showed abnormal estrous cyclicity; C, animals that died during the study; T, total (A+B+C).

a: Values represent the number of animals that showed abnormal findings.

b: Organs/tissues examined were the liver, kidneys, thymus, thyroids, spleen, adrenals, bone marrow (femur), mesenteric lymph node, Peyer's patch, ovaries, uterus, vagina, mammary gland and pituitary gland.

c: Statistical analyses were made between the control and 4500 ppm groups based on the total number of animals examined.

d: Values in parentheses are the number of animals examined.

e: The number of animals examined on the kidney was 23 because both sides of the kidneys in one dead animal showed autolysis.

-: Not applicable.

Table 32 Number of primordial follicles in F1 parental female rats treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Group	Number of animals		Number of primordial follicles ^a
F1	Control	10	Mean	323.1
			S.D.	56.6
	DCBS 4500 ppm	10	Mean	255.4
			S.D.	109.1

a: Counted based on a 5% nonrandom sample (every twentieth serial section) from right ovary of each animal.

Table 33 General appearance in F1 and F2 male rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Item	Postnatal day 0			
		Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	22	24	24	24
	Number of pups examined	149	175	167	158
	Number of pups with abnormal findings	2 (0.98)	2 (1.46)	1 (0.42)	1 (1.39)
	Findings ^a Found dead	2 (0.98)	2 (1.46)	1 (0.42)	1 (1.39)
F2	Number of litters examined	23	22	21	24
	Number of pups examined	143	143	147	163
	Number of pups with abnormal findings	0 (0.00)	1 (0.65)	2 (1.55)	8 (4.67)*
	Findings ^a Found dead	0 (0.00)	1 (0.65)	2 (1.55)	8 (4.67)*

(to be continued)

Values in parentheses represent the means of incidences of pups with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of pups that showed abnormal findings.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Wilcoxon rank-sum test.

Table 33 (continued-1) General appearance in F1 and F2 male rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Item	Postnatal days 1-4			
		Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	22	24	24	24
	Number of pups examined	147	173	166	157
	Number of pups with abnormal findings	1 (0.91)	3 (1.40)	8 (4.73)	3 (1.74)
	Findings ^a Found dead/lost	1 (0.91)	3 (1.40)	8 (4.73)	3 (1.74)
F2	Number of litters examined	23	22	21	24
	Number of pups examined	143	142	145	155
	Number of pups with abnormal findings	6 (4.09)	9 (4.55)	11 (7.80)	18 (12.56)
	Findings ^a				
	Scab on auricle	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.68)	0 (0.00)
	Found dead/lost	6 (4.09)	9 (4.55)	10 (7.12)	18 (12.56)

(to be continued)

Values in parentheses represent the means of incidences of pups with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of pups that showed abnormal findings.

Table 33 (continued-2) General appearance in F1 and F2 male rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	Postnatal days 5-21			
		Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	22	24	24	24
	Number of pups examined	86	98	95	97
	Number of pups with abnormal findings	0 (0.00)	1 (1.04)	1 (1.39)	0 (0.00)
	Findings ^a Found dead/lost	0 (0.00)	1 (1.04)	1 (1.39)	0 (0.00)
F2	Number of litters examined	23	22	21	23
	Number of pups examined	87	81	81	92
	Number of pups with abnormal findings	0 (0.00)	1 (1.14)	2 (2.38)	2 (2.17)
	Findings ^a				
	Microphthalmia	0 (0.00)	1 (1.14)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Lost	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (2.38)	2 (2.17)

(to be continued)

Values in parentheses represent the means of incidences of pups with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of pups that showed abnormal findings.

Table 33 (continued-3) General appearance in F1 and F2 male rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Item	Postnatal days 22-26			
		Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	22	24	24	24
	Number of weanlings examined	86	97	94	97
	Number of weanlings with abnormal findings	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
F2	Number of litters examined	22	22	21	23
	Number of weanlings examined	83	81	79	90
	Number of weanlings with abnormal findings	0 (0.00)	1 (1.14)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Findings ^a Microphthalmia	0 (0.00)	1 (1.14)	0 (0.00)	0 (0.00)

Values in parentheses represent the means of incidences of weanlings with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of weanlings that showed abnormal findings.

Table 34 General appearance in F1 and F2 female rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Item	Postnatal day 0			
		Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	22	24	24	24
	Number of pups examined	133	141	163	143
	Number of pups with abnormal findings	1 (0.45)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (1.22)
	Findings ^a Found dead	1 (0.45)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (1.22)
F2	Number of litters examined	23	22	20	24
	Number of pups examined	150	134	117	149
	Number of pups with abnormal findings	4 (2.42)	0 (0.00)*	2 (1.83)	4 (2.43)
	Findings ^a Found dead	4 (2.42)	0 (0.00)*	2 (1.83)	4 (2.43)

(to be continued)

Values in parentheses represent the means of incidences of pups with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of pups that showed abnormal findings.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Wilcoxon rank-sum test.

Table 34 (continued-1) General appearance in F1 and F2 female rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	Postnatal days 1-4			
		Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	22	24	24	24
	Number of pups examined	132	141	163	141
	Number of pups with abnormal findings	4 (3.05)	3 (1.81)	3 (1.88)	4 (2.22)
	Findings ^a				
	Trauma and scab on forelimb	1 (0.76)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Found dead/lost	3 (2.29)	3 (1.81)	3 (1.88)	4 (2.22)
F2	Number of litters examined	23	22	20	24
	Number of pups examined	146	134	115	145
	Number of pups with abnormal findings	8 (3.98)	10 (7.05)	5 (4.43)	16 (10.68)
	Findings ^a				
	Scab on hindlimb	0 (0.00)	1 (0.76)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Found dead/lost	8 (3.98)	9 (6.29)	5 (4.43)	16 (10.68)

(to be continued)

Values in parentheses represent the means of incidences of pups with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of pups that showed abnormal findings.

Table 34 (continued-2) General appearance in F1 and F2 female rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	Postnatal days 5-21			
		Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	22	24	24	24
	Number of pups examined	88	94	97	95
	Number of pups with abnormal findings	0 (0.00)	1 (1.04)	0 (0.00)	1 (1.04)
	Findings ^a Found dead/lost	0 (0.00)	1 (1.04)	0 (0.00)	1 (1.04)
F2	Number of litters examined	23	22	20	23
	Number of pups examined	90	80	77	86
	Number of pups with abnormal findings	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (4.17)	2 (2.54)
	Findings ^a Found dead/lost	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (4.17)	2 (2.54)

(to be continued)

Values in parentheses represent the means of incidences of pups with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of pups that showed abnormal findings.

Table 34 (continued-3) General appearance in F1 and F2 female rat pups and weanlings during postnatal days 0-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	Postnatal days 22-26			
		Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	22	24	24	24
	Number of weanlings examined	88	93	97	94
	Number of weanlings with abnormal findings	0 (0.00)	2 (2.08)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Findings ^a				
	Found dead	0 (0.00)	2 (2.08)	0 (0.00)	0 (0.00)
F2	Number of litters examined	22	22	20	23
	Number of weanlings examined	86	80	74	84
	Number of weanlings with abnormal findings	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

Values in parentheses represent the means of incidences of weanlings with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of weanlings that showed abnormal findings.

Table 35 Body weights of F1 and F2 rat pups treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of litters		Male					Female				
				Body weight (g) on postnatal day					Body weight (g) on postnatal day				
				0	4	7	14	21	0	4	7	14	21
F1	Control	22	Mean	6.9	11.2	18.6	37.2	62.3	6.5	10.9	18.1	36.3	60.7
			S.D.	0.5	1.1	1.8	3.6	5.6	0.5	1.3	1.9	3.5	5.2
	DCBS 80 ppm	24	Mean	6.7	10.5	18.1	36.8	62.2	6.3	10.1	17.1	34.8	58.5
			S.D.	0.6	1.2	1.7	2.4	3.7	0.5	1.4	2.3	3.6	6.0
	DCBS 600 ppm	24	Mean	6.7	10.5	17.7	36.0	60.2	6.3	10.0	17.2	35.0	58.2
			S.D.	0.6	1.4	2.5	4.0	6.3	0.5	1.2	2.3	4.0	6.5
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	6.6	10.3 *	16.7 **	33.6 ^{\$\$}	55.3 **	6.3	9.9 *	16.2 **	32.8 **	53.7 **
			S.D.	0.7	1.0	1.6	2.5	4.8	0.6	1.0	1.4	2.6	4.5
	Control	23				(22)	(22)	(22)			(22)	(22)	(22)
			Mean	6.8	11.0	18.5	37.1	62.5	6.5	10.5	17.6	35.9	59.6
	DCBS 80 ppm	22	S.D.	0.9	2.3	2.7	4.0	7.0	1.0	2.3	2.9	4.1	6.6
			Mean	6.7	11.1	18.4	37.8	63.4	6.3	10.5	17.7	36.6	60.7
	DCBS 600 ppm	21	S.D.	0.8	2.6	3.8	6.3	9.4	0.7	2.5	3.8	5.7	8.5
									(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	6.7	10.0	17.1	35.5	60.6	6.3	9.7	16.3	33.5	56.3
			S.D.	0.5	2.1	2.8	3.8	5.6	0.4	2.0	2.8	4.9	7.0
	DCBS 4500 ppm	24			(23)	(23)	(23)	(23)		(23)	(23)	(23)	(23)
			Mean	6.7	10.0	15.9 *	32.3 **	53.5 **	6.3	9.5	15.5	31.7 *	52.0 **
	DCBS 4500 ppm	24	S.D.	0.6	1.4	2.3	4.1	5.9	0.7	1.5	2.2	3.9	5.7

Values in parentheses are the number of litters examined.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

^{\$\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 36 Anogenital distance of F1 and F2 rat pups on postnatal day 4 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of litters		Male		Female	
				AGD (mm)	AGD/(BW) ^{1/3}	AGD (mm)	AGD/(BW) ^{1/3}
F1	Control	22	Mean	5.60	2.51	3.02	1.36
			S.D.	0.28	0.09	0.11	0.05
	DCBS 80 ppm	24	Mean	5.50	2.52	2.95	1.37
			S.D.	0.28	0.08	0.14	0.06
	DCBS 600 ppm	24	Mean	5.51	2.52	2.99	1.39
			S.D.	0.41	0.12	0.14	0.04
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	5.54	2.55	2.96	1.38
			S.D.	0.28	0.09	0.14	0.04
F2	Control	23	Mean	5.54	2.50	2.93	1.34
			S.D.	0.51	0.12	0.19	0.04
	DCBS 80 ppm	22	Mean	5.60	2.53	2.91	1.34
			S.D.	0.55	0.14	0.22	0.06
	DCBS 600 ppm	21	Mean	5.39	2.51	(20)	(20)
			S.D.	0.56	0.12	2.88	1.35
	DCBS 4500 ppm	23	Mean	5.47	2.55	2.85	1.35
			S.D.	0.38	0.08	0.18	0.05

Values in parentheses are the number of litters examined.

AGD: Anogenital distance.

BW: Body weight.

Table 37 Physical development in F1 and F2 rat pups treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of litters		Male						Female					
				Pinna detachment				Incisor eruption	Eye opening	Pinna detachment				Incisor eruption	Eye opening
				Completion rate (%) on postnatal day				Age at completion (days)	Age at completion (days)	Completion rate (%) on postnatal day				Age at completion (days)	Age at completion (days)
				1	2	3	4			1	2	3	4		
F1	Control	22	Mean	6.3	25.5	95.9	100.0	10.2	14.5	6.4	33.9	97.2	100.0	10.1	14.4
			S.D.	18.3	35.3	11.3	0.0	0.6	0.6	21.0	38.9	7.6	0.0	0.6	0.6
	DCBS 80 ppm	24	Mean	1.2	31.2	93.8	100.0	10.8 **	14.5	3.5	39.3	93.4	99.4	10.7 **	14.5
			S.D.	4.0	41.7	15.1	0.0	0.6	0.5	8.6	43.4	15.7	2.9	0.7	0.7
	DCBS 600 ppm	24	Mean	0.0	15.2	94.4	100.0	10.3	14.7	0.0	20.0	93.3	100.0	10.2	14.4
			S.D.	0.0	22.8	20.7	0.0	0.6	0.5	0.0	32.4	21.1	0.0	0.7	0.4
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	5.0	23.6	99.3	100.0	10.5	14.6	4.2	27.1	99.5	100.0	10.2	14.5
			S.D.	16.9	33.7	3.4	0.0	0.4	0.5	20.4	34.4	2.3	0.0	0.6	0.5
	Control	23	Mean	13.8	30.0	87.2	100.0	(22) 9.7	(22) 14.4	10.3	30.2	88.0	99.1	(22) 9.8	(22) 14.3
			S.D.	32.0	44.2	29.1	0.0	0.7	0.7	28.4	40.0	29.2	4.2	0.7	0.6
	DCBS 80 ppm	22	Mean	9.1	28.6	91.5	100.0	10.6 **	14.6	7.6	30.8	91.7	97.7	10.4 *	14.4
			S.D.	29.4	41.1	23.1	0.0	0.9	0.8	25.1	43.8	22.4	10.7	0.8	0.8
	DCBS 600 ppm	21	Mean	3.1	26.1	86.6	100.0	9.9	14.3	(20) 0.7	(20) 26.1	(20) 91.7	(20) 100.0	(20) 10.0	(20) 14.4
			S.D.	11.2	40.5	23.2	0.0	0.6	0.7	3.2	37.8	15.0	0.0	0.6	0.5
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	1.7	31.7	(23) 92.4	(23) 100.0	(23) 10.3 *	(23) 14.6			(23) 92.6	(23) 100.0	(23) 10.4 *	(23) 14.5
			S.D.	8.2	38.8	18.0	0.0	0.8	0.6	15.4	40.0	18.3	0.0	0.9	0.7

Values in parentheses are the number of litters examined.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

Table 38 Reflex response tests in F1 and F2 rat pups treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Male					Female				
				Surface righting reflex		Negative geotaxis reflex		Air righting reflex	Surface righting reflex		Negative geotaxis reflex		Air righting reflex
				Success rate (%)	Response time (sec)	Completion ratio (%)	Response time (sec)	Success rate (%)	Success rate (%)	Response time (sec)	Completion ratio (%)	Response time (sec)	Success rate (%)
F1	Control	22	Mean	100.0	2.1	22/22	14.5	100.0	100.0	2.8	22/22	15.3	100.0
			S.D.	0.0	1.6	(100.0)	8.0	0.0	0.0	3.4	(100.0)	6.8	0.0
	DCBS 80 ppm	24	Mean	100.0	1.5	24/24	15.4	100.0	100.0	1.6	24/24	14.1	100.0
			S.D.	0.0	0.5	(100.0)	8.2	0.0	0.0	0.6	(100.0)	6.0	0.0
	DCBS 600 ppm	24	Mean	100.0	2.4	24/24	13.8	100.0	100.0	1.9	24/24	15.4	100.0
			S.D.	0.0	2.3	(100.0)	6.4	0.0	0.0	0.9	(100.0)	6.2	0.0
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	100.0	1.8	24/24	16.0	100.0	100.0	3.4	24/24	18.3	100.0
			S.D.	0.0	1.2	(100.0)	7.5	0.0	0.0	3.9	(100.0)	7.6	0.0
	Control	22	Mean	100.0	2.5	22/22	15.3	100.0	100.0	2.6	22/22	16.9	100.0
			S.D.	0.0	1.6	(100.0)	6.3	0.0	0.0	1.8	(100.0)	7.2	0.0
	DCBS 80 ppm	22	Mean	100.0	2.2	22/22	17.2	98.5	97.0	2.4	22/22	14.0	100.0
			S.D.	0.0	1.8	(100.0)	7.4	7.1	14.2	2.0	(100.0)	6.5	0.0
F2	DCBS 600 ppm	21	Mean	100.0	1.7	21/21	14.4	100.0	100.0	2.5	20/20	12.6	98.3
			S.D.	0.0	0.5	(100.0)	5.7	0.0	0.0	1.7	(100.0)	8.1	7.4
	DCBS 4500 ppm	23	Mean	100.0	2.1	23/23	16.1	100.0	100.0	3.2	22/23	16.0	100.0
			S.D.	0.0	1.9	(100.0)	4.9	0.0	0.0	4.5	(95.7)	6.2	0.0

Surface righting reflex, negative geotaxis reflex and air righting reflex were examined on postnatal day 5, 8 and 18, respectively.

Completion ratio (%) = (number of animals showing positive response/number of animals examined) x 100.

Values in parentheses are the number of animals examined.

Table 39 Autopsy findings in F1 and F2 male rat pups euthanized on postnatal day 4 or found dead on postnatal days 0-4 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	17	23	21	21
	Number of pups examined	62	77	67	61
	Number of pups with abnormal findings	0 (0.00)	1 (1.09)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Findings ^a				
	Liver: Yellowish white discoloration	0 (0.00)	1 (1.09)	0 (0.00)	0 (0.00)
F2	Number of litters examined	17	17	15	19
	Number of pups examined	52	58	57	59
	Number of pups with abnormal findings	2 (1.96)	1 (1.47)	1 (2.22)	1 (2.63)
	Findings ^a				
	Auricle: Scab	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (2.22)	0 (0.00)
	Digestive tract: Retention, gas	2 (1.96)	1 (1.47)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Kidney: Dilatation, renal pelvis	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (2.63)

Values in parentheses represent the means of incidences of pups with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of pups that showed abnormal findings.

Table 40 Autopsy findings in F1 and F2 female rat pups euthanized on postnatal day 4 or found dead on postnatal days 0-4 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	17	18	21	17
	Number of pups examined	44	46	64	46
	Number of pups with abnormal findings	3 (7.06)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Findings ^a				
	Liver: Yellowish white discoloration	1 (2.94)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Kidney: Dilatation, renal pelvis	1 (1.18)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Ureter: Dilatation	1 (1.18)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Forelimb: Scab	1 (2.94)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
F2	Number of litters examined	18	14	15	19
	Number of pups examined	53	49	37	51
	Number of pups with abnormal findings	2 (11.11)	1 (3.57)	1 (3.33)	1 (2.63)
	Findings ^a				
	Digestive tract: Retention, gas	1 (5.56)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (2.63)
	Digestive tract: Dark red contents	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (3.33)	0 (0.00)
	Forelimb: Oligodactyly	1 (5.56)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Hindlimb: Scab	0 (0.00)	1 (3.57)	0 (0.00)	0 (0.00)

Values in parentheses represent the means of incidences of pups with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of pups that showed abnormal findings.

Table 41 Autopsy findings in F1 and F2 male rat weanlings euthanized on postnatal day 26 or animals found dead on postnatal days 5-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	22	24	24	24
	Number of animals examined	62	73	71	73
	Number of animals with abnormal findings	0 (0.00)	1 (1.39)	3 (4.17)	1 (1.39)
	Findings ^a				
	Ileum: Diverticulum	0 (0.00)	1 (1.39)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Kidney: Dilatation, renal pelvis	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (4.17)	1 (1.39)
F2	Number of litters examined	23	22	21	23
	Number of animals examined	87 ^b	81	79	90
	Number of animals with abnormal findings	2 (2.90)	6 (6.59)	6 (7.86)	4 (4.35)
	Findings ^a				
	Eyeball: Microphthalmia	0 (0.00)	1 (1.14)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Kidney: Dilatation, renal pelvis	1 (1.45)	5 (5.45)	6 (7.86)*	3 (3.26)
	Testis: Small size	1 (1.45)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.09)
	Epididymis: Small size	1 (1.45)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.09)

Values in parentheses represent the means of incidences of animals with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of animals that showed abnormal findings.

b: Including pups that were euthanized on postnatal day 5 because of maternal death.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Wilcoxon rank-sum test.

Table 42 Autopsy findings in F1 and F2 female rat weanlings euthanized on postnatal day 26 or animals found dead on postnatal days 5-26 treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Item	Control	DCBS (ppm)		
			80	600	4500
F1	Number of litters examined	22	24	24	24
	Number of animals examined	64	70	73	70
	Number of animals with abnormal findings	5 (9.09)	3 (4.51)	0 (0.00)	5 (7.64)
	Findings ^a				
	Cerebrum: Dilatation, ventricle	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.39)
	Glandular stomach: Fine dark red patch, mucosa, multifocal	0 (0.00)	1 (1.39)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Ileum: Diverticulum	1 (1.52)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	Kidney: Dilatation, renal pelvis	4 (7.58)	2 (3.13)	0 (0.00)	4 (6.25)
	Urinary bladder: Dark red contents	0 (0.00)	1 (1.39)	0 (0.00)	0 (0.00)
F2	Number of litters examined	23	22	20	23
	Number of animals examined	90 ^b	80	74	85
	Number of animals with abnormal findings	0 (0.00)	1 (1.14)	6 (7.50)*	2 (2.32)
	Findings ^a				
	Ileum: Diverticulum	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (2.50)	0 (0.00)
	Digestive tract: Retention, gas	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.45)
	Kidney: Dilatation, renal pelvis	0 (0.00)	1 (1.14)	4 (5.00)	1 (0.87)

Values in parentheses represent the means of incidences of animals with abnormal findings (%; the litter is the unit evaluated).

a: Values represent the number of animals that showed abnormal findings.

b: Including pups that were euthanized on postnatal day 5 because of maternal death.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Wilcoxon rank-sum test.

Table 43 Absolute and relative organ weights in F1 and F2 male rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Body weight	Brain		Thymus		Liver		Kidney ^a		Spleen	
				g	g	%	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
F1	Control	22	Mean	92.2	1.69	1.84	359	388	4.16	4.51	1.023	1.110	394	425
			S.D.	8.0	0.07	0.13	68	52	0.49	0.26	0.111	0.073	68	52
	DCBS 80 ppm	24	Mean	88.9	1.69	1.91	350	393	4.09	4.60	1.040	1.171 *	352	395
			S.D.	6.2	0.05	0.13	53	50	0.37	0.25	0.079	0.064	68	63
	DCBS 600 ppm	24	Mean	88.1	1.70	1.94	365	416	4.09	4.64 ^{\$}	1.003	1.137	356	405
			S.D.	9.1	0.08	0.15	52	61	0.44	0.15	0.135	0.079	61	59
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	78.2 **	1.63 **	2.09 **	278 ^{\$\$}	357	3.83 *	4.89 ^{\$\$}	0.894 ^{\$\$}	1.146	278 **	357 **
			S.D.	7.2	0.07	0.17	37	48	0.51	0.28	0.069	0.073	41	48
F2	Control	22	Mean	90.8	1.67	1.85	355	392	4.08	4.49	1.006	1.109	383	422
			S.D.	8.7	0.08	0.14	56	58	0.47	0.23	0.102	0.037	61	49
	DCBS 80 ppm	22	Mean	91.4	1.69	1.87	325	355	4.12	4.50	1.009	1.105	350 ^{\$}	381 *
			S.D.	13.1	0.09	0.22	64	47	0.66	0.26	0.147	0.066	83	53
	DCBS 600 ppm	21	Mean	89.1	1.70	1.92	361	406	4.21	4.72 ^{\$\$}	1.022	1.146 ^{\$}	356	400
			S.D.	6.5	0.08	0.13	47	48	0.44	0.27	0.089	0.049	46	50
	DCBS 4500 ppm	23	Mean	80.0 ^{\$\$}	1.63	2.05 **	283 **	354 *	3.74	4.66 ^{\$\$}	0.923	1.152 ^{\$}	286 ^{\$\$}	357 **
			S.D.	7.8	0.09	0.18	52	55	0.54	0.42	0.133	0.117	52	54

(to be continued)

a: Values represent the total weights of the organs of both sides.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

^{\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Mann-Whitney U-test.

^{\$\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 43 (continued) Absolute and relative organ weights in F1 and F2 male rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Adrenal ^a		Testis ^a		Epididymis ^a		Prostate	
				mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
F1	Control	22	Mean	25.5	27.8	561	608	78.6	85.5	49.2	53.3
			S.D.	2.6	2.9	77	61	9.4	9.8	9.8	9.1
	DCBS 80 ppm	24	Mean	25.5	28.7	542	610	77.3	86.9	47.5	53.4
			S.D.	3.3	3.0	64	55	9.5	8.4	7.8	7.8
	DCBS 600 ppm	24	Mean	25.0	28.4	541	612	75.9	86.4	43.7	49.6
			S.D.	3.3	3.1	88	58	11.6	11.3	10.1	10.7
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	22.4 **	28.8	529	677 ^{\$\$}	71.3 *	91.3	42.3 *	54.0
			S.D.	2.9	4.0	88	95	10.2	11.7	8.9	9.5
F2	Control	22	Mean	25.5	28.1	548	602	79.5	87.6	50.9	55.6
			S.D.	2.8	2.8	106	89	12.5	10.6	16.6	15.0
	DCBS 80 ppm	22	Mean	24.1	26.5	516	563	72.9	80.4	44.6	48.9
			S.D.	3.4	2.6	103	69	12.3	12.6	10.4	9.9
	DCBS 600 ppm	21	Mean	24.2	27.2	528	590	72.7	81.7	47.0	52.7
			S.D.	3.8	4.3	82	65	10.0	10.6	10.3	10.1
	DCBS 4500 ppm	23	Mean	22.7 *	28.5	525	653	71.3	89.0	42.6	52.9
			S.D.	3.4	4.2	98	91	11.2	10.0	12.2	13.1

a: Values represent the total weights of the organs of both sides.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

^{\$\$}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 44 Absolute and relative organ weights in F1 and F2 female rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Body weight	Brain		Thymus		Liver		Kidney ^a		Spleen	
				g	g	%	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
F1	Control	22	Mean	85.9	1.62	1.90	361	418	3.72	4.33	0.954	1.110	338	392
			S.D.	7.8	0.07	0.14	77	65	0.44	0.34	0.108	0.068	58	43
	DCBS 80 ppm	24	Mean	82.5	1.65	2.01	327	398	3.52	4.27	0.967	1.173 **	323	392
			S.D.	6.4	0.05	0.17	49	60	0.35	0.22	0.081	0.055	47	54
	DCBS 600 ppm	24	Mean	82.8	1.64	2.00	350	423	3.65	4.41	0.940	1.133	316	382
			S.D.	7.2	0.05	0.16	60	63	0.40	0.29	0.114	0.065	53	55
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	74.3 **	1.57 **	2.13 **	281 \$\$	379	3.43 *	4.62 **	0.850 **	1.148	249 \$\$	337 **
			S.D.	6.7	0.05	0.16	43	56	0.40	0.31	0.082	0.088	32	49
F2	Control	22	Mean	83.6	1.62	1.96	364	439	3.71	4.44	0.915	1.096	340	407
			S.D.	9.5	0.08	0.20	50	63	0.47	0.18	0.093	0.046	63	58
	DCBS 80 ppm	22	Mean	87.2	1.66	1.92	326	373 **	3.87	4.44	0.983	1.129	331	380
			S.D.	10.8	0.07	0.19	66	56	0.50	0.23	0.137	0.085	55	46
	DCBS 600 ppm	20	Mean	82.4	1.66	2.03	348	424	3.80	4.61 *	0.960	1.164 \$\$	320	389
			S.D.	6.5	0.05	0.16	68	80	0.37	0.19	0.111	0.083	46	56
	DCBS 4500 ppm	23	Mean	74.6 **	1.57 *	2.11 *	283 **	379 **	3.57	4.78 **	0.885	1.187 \$\$	274 **	370
			S.D.	7.9	0.07	0.18	56	63	0.46	0.26	0.101	0.061	40	52

(to be continued)

a: Values represent the total weights of the organs of both sides.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Dunnett's test.

\$\$: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 44 (continued) Absolute and relative organ weights in F1 and F2 female rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Generation	Group	Number of animals		Adrenal ^a		Ovary ^a		Uterus	
				mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
F1	Control	22	Mean	23.8	27.8	23.2	27.1	58.2	67.9
			S.D.	2.6	2.8	3.3	3.3	14.5	15.8
	DCBS 80 ppm	24	Mean	24.5	29.8	22.2	27.0	55.8	67.9
			S.D.	2.7	3.6	3.4	4.0	7.6	9.9
	DCBS 600 ppm	24	Mean	23.1	27.9	20.5 *	24.8	62.1	75.2
			S.D.	2.9	2.6	3.2	4.3	12.3	14.1
	DCBS 4500 ppm	24	Mean	21.5 *	29.1	20.3 *	27.5	48.4 ^S	65.0
			S.D.	2.4	3.6	3.2	4.7	11.8	14.1
F2	Control	22	Mean	23.6	28.4	22.0	26.6	61.8	73.3
			S.D.	2.9	3.3	3.9	5.2	18.9	17.2
	DCBS 80 ppm	22	Mean	23.3	26.7	22.5	26.0	58.1	67.0
			S.D.	4.0	3.3	2.8	3.0	11.9	13.5
	DCBS 600 ppm	20	Mean	22.2	27.0	20.9	25.5	50.0 ^S	60.7 *
			S.D.	3.3	4.0	3.1	4.4	10.0	11.5
	DCBS 4500 ppm	23	Mean	21.6	29.0	21.4	29.0	46.6 ^{SS}	62.3 *
			S.D.	3.0	3.9	2.9	4.3	12.9	15.0

a: Values represent the total weights of the organs of both sides.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Dunnett's test.

^S: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$ by Mann-Whitney U-test.

^{SS}: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$ by Mann-Whitney U-test.

Table 45 Histopathological findings in F1 and F2 rat weanlings treated with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in the two-generation reproductive toxicity study (SR05241)

Gener- ation	Item	Male		Female	
		Control	DCBS 4500 ppm	Control	DCBS 4500 ppm
F1	Number of weanlings examined ^a	22	24	22	24
	Number of weanlings with abnormal findings	0	0	0	0
F2	Number of weanlings examined ^a	22	23	22	23
	Number of weanlings with abnormal findings	0	0	0	0

a: Weanlings were examined on the liver, spleen and thymus in the control and DCBS 4500 ppm groups.