

# 最終報告書

(メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドの  
ラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験  
(試験番号：10-035)

## 陳 述 書 (I)

### 試験の表題

(メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドのラットを用いる  
簡易生殖毒性試験 (試験番号: 10-035)

本試験は、OECD 試験法ガイドライン[OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS for Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test 421、(1995)]並びに化学物質 GLP「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121003 号厚生労働省医薬食品局長、平成 15 年・11・17 製局第 3 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 031121004 号環境省総合環境政策局長、連名通知)(最終改正:平成 18 年 11 月 20 日付け薬食発第 1120001 号、平成 18・11・13 製局第 5 号及び環保企発第 061120001 号)に定める基準に準拠して実施した。

### 試験責任者

安全性研究部 首席研究員



平成23年 3月 23日

## 陳 述 書 (Ⅱ)

### 試験の表題

(メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドのラットを用いる  
簡易生殖毒性試験 (試験番号: 10-035)

本試験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号)、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「厚生労働省の所管する実施機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」及び「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(2006 年 6 月 1 日、日本学術会議)に基づき、実験動物を科学的観点及び倫理的な配慮の下に実施するべき事項を定めた、「財団法人 畜産生物科学安全研究所の動物実験実施規定」に従い、実験動物委員会の承認を得て、実施した。

### 試験責任者

安全性研究部 首席研究員



平成 23 年 3 月 23 日

## 試験の表題

(メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドのラットを用いる  
簡易生殖毒性試験 (試験番号：10-035)

## 試験委託者

名 称 厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室  
所 在 地 東京都千代田区霞が関 1-2-2

## 試験実施施設

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所  
所 在 地 神奈川県相模原市緑区橋本台 3-7-11  
運営管理者 専務理事 [REDACTED]  
試験責任者 安全性研究部 [REDACTED]  
信頼性保証責任者 信頼性保証室 [REDACTED]

## 試験日程

試験開始	平成 22 年 8 月 17 日
動物搬入	平成 22 年 8 月 19 日
実験開始	平成 22 年 8 月 31 日
投与開始	平成 22 年 9 月 1 日
交配開始	平成 22 年 9 月 15 日
児動物解剖開始	平成 22 年 10 月 12 日
雌親解剖開始	平成 22 年 10 月 13 日
雄親解剖	平成 22 年 10 月 13 日
実験終了	平成 23 年 2 月 20 日
試験終了	平成 23 年 3 月 23 日

予見することができなかった試験に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書からの逸脱

本試験に関し、予見することのできなかつた試験成績の信頼性に影響を及ぼす疑いの

ある事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

#### 試資料の保管

次に示す本試験に関する一連の関係試資料は、試験終了後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の処置については、試験委託者と協議して決定する。

- 1) 試験計画書
- 2) 被験物質に関する記録およびそのサンプル
- 3) 供試動物に関する記録
- 4) 試験結果に関する記録（親動物の一般状態、体重、摂餌量、性周期、交配、分娩、哺育、剖検、器官重量、病理組織学検査ならびに児動物の一般状態、成長、外表および内臓検査等に関する生データ）
- 5) 病理標本（固定器官、包埋ブロック、組織標本）
- 6) 信頼性保証に関する記録
- 7) 最終報告書

#### 試験責任者の署名および試験担当者の業務分担

##### 試験責任者

財団法人 畜産生物科学安全研究所  
安全性研究部 首席研究員

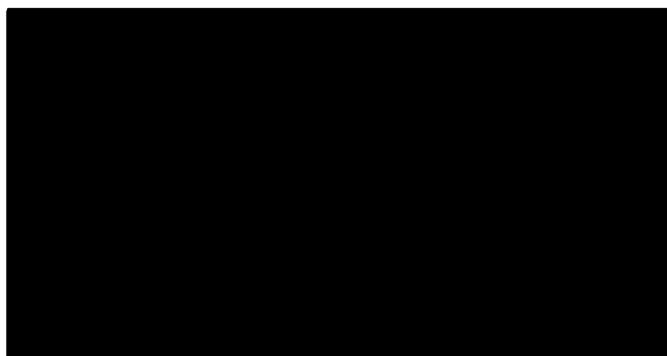
氏名



平成23年 3月 23日

#### 試験担当者およびその業務分担

検疫責任者 :  
投与液の分析 :  
投与液の調製 :  
動物飼育・投与・臨床観察 :  
病理検査 :



## 信頼性保証証明書

試験表題：(メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドの  
ラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：10-035

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
1. 試験計画書審査 平成22年08月17日	平成22年08月18日	平成22年08月18日
2. 試験計画書記載事項変更審査		
(変-1) 平成22年09月02日	平成22年09月03日	平成22年09月03日
(変-2) 平成23年01月12日	平成23年01月12日	平成23年01月12日
3. 試験実施状況査察		
動物導入 平成22年08月19日	平成22年08月19日	平成22年08月19日
検 疫 平成22年08月20日	平成22年08月20日	平成22年08月20日
群分け・個体識別・被験物質調製 平成22年08月31日	平成22年08月31日	平成22年08月31日
体重測定・餌測定・投与・症状観察 平成22年09月01日	平成22年09月01日	平成22年09月01日
交配開始 平成22年09月15日	平成22年09月15日	平成22年09月15日
交尾確認 平成22年09月16日	平成22年09月16日	平成22年09月16日
体重測定・餌測定・投与・症状観察 平成22年09月28日	平成22年09月28日	平成22年09月28日
分娩の確認 平成22年10月08日	平成22年10月08日	平成22年10月08日
被験物質調製 平成22年10月12日	平成22年10月12日	平成22年10月12日
解剖(新生児・雄・雌)・病理組織標本作製(臓器・組織の固定) 平成22年10月13日	平成22年10月13日	平成22年10月13日
病理組織標本作製(切り出し) 平成22年12月20日	平成22年12月20日	平成22年12月20日

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
病理組織標本作製(包埋) 平成22年12月28日	平成23年01月04日	平成23年01月04日
病理組織標本作製(薄切・染色) 平成23年01月04日	平成23年01月04日	平成23年01月04日
4. 生データ査察 平成23年03月10日	平成23年03月10日	平成23年03月10日
5. 報告書(草案)審査 平成23年03月11日 平成23年03月14日	平成23年03月14日	平成23年03月14日
6. 最終報告書審査 平成23年03月23日	平成23年03月23日	平成23年03月23日

上記の審査・査察により、本試験が「化審法 GLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用した方法・手順が忠実に記載され、試験成績には、当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認した。

平成 23 年 3 月 23 日  
財団法人 畜産生物科学安全研究所

信頼性保証責任者



## 目 次

要約 .....	1 頁
目的 .....	2
材料および方法 .....	2
1. 被験物質 .....	2
2. 動物および飼育条件 .....	2
3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法 .....	3
4. 観察および検査 .....	4
1) 親動物に関する項目 .....	4
(1) 一般状態 .....	4
(2) 体重および摂餌量 .....	4
(3) 雌の性周期検査 .....	4
(4) 交配および分娩状態観察 .....	4
(5) 剖検および器官重量 .....	5
(6) 病理組織学検査 .....	5
2) 新生児に関する項目 .....	5
(1) 産児数、性比および外表観察 .....	5
(2) 一般状態・生児数 .....	6
(3) 体重 .....	6
(4) 病理学検査 .....	6
5. 統計解析 .....	6
結果 .....	8
1. 反復投与毒性 .....	8
1) 一般状態および死亡 .....	8
2) 体重 .....	8
3) 摂餌量 .....	8
4) 剖検 .....	8
5) 器官重量 .....	8
6) 病理組織学検査 .....	8

2. 生殖発生毒性	8
1) 親動物に及ぼす影響	8
(1) 性周期検査	9
(2) 交尾率および受胎率	9
(3) 黄体数、着床数および着床率	9
(4) 妊娠期間および出産率	9
(5) 分娩および哺育状態	9
2) 新生児に及ぼす影響	9
(1) 生存性および体重	9
(2) 病理学検査	9
考察	10
文献	11
添付資料	
A 図・群別平均値表	
Figures 1、2	体重 1
Figures 3、4	摂餌量 3
Tables 1、2	一般状態および死亡率 5
Tables 3、4	体重 7
Tables 5、6	摂餌量 9
Tables 7、8	剖検 11
Table 9	器官重量 13
Tables 10、11	病理組織学検査 14
Table 12	生殖に及ぼす影響 17
Table 13	新生児に及ぼす影響 18
Table 14	新生児の外表所見 19
Table 15	新生児の内臓所見 20
B. 個体別表等	
Appendix 1	被験物質の特性 1
Appendix 2	被験物質の投与形態での安定性 2

Appendix 3	投与液中の被験物質濃度の確認	3
Appendix 4	動物室の温度湿度の測定結果	4
Appendix 5	飼料の汚染物質分析	6
Appendix 6	床敷の汚染物質分析	10
Appendix 7	飲料水の水質検査	12
Appendices 8、9	死亡率	13
Appendices 10、11	一般状態	21
Appendices 12、13	体重	23
Appendices 14、15	摂餌量	27
Appendices 16、17	剖検・病理組織学検査	31
Appendices 18、19	器官重量	40
Appendices 20、21	性周期	44
Appendix 22	生殖に及ぼす影響	49
Appendix 23	新生児に及ぼす影響	53
Appendix 24	新生児の外表所見	57
Appendix 25	新生児の内臓所見	59

## 要 約

化学産業の分野において、高分子凝集剤、製紙用各種添加剤、塗料および接着剤等に使用されている（メタクリロイルオキシエチル）トリメチルアンモニウムクロリド<sup>1)</sup>の0、100、300および1000 mg/kg/dayを、1群雌雄各12匹のSD系ラットに、交配開始2週間前から、雄は42日間、雌は分娩後哺育4日（42～46日間）まで経口投与し、その生殖毒性を調べた。

### 1. 反復投与毒性

1000 mg/kg 群で雌の妊娠7日の摂餌量に有意な低値が認められたのみで、いずれの被験物質投与群とも、一般状態、体重、摂餌量、剖検、器官重量および病理組織学検査において毒性影響は認められなかった。

### 2. 生殖発生毒性

親動物について、性周期（雌）、交尾成立期間、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩率に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

児動物についても、総出産児数、生児総数、生存率、分娩率、出生率、性比、体重および形態に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、（メタクリロイルオキシエチル）トリメチルアンモニウムクロリドの親動物への反復投与において、いずれの被験物質投与群においても毒性影響は認められなかったことから、反復投与毒性における無影響量（NOEL）は雌雄ともに1000 mg/kg/dayと推定した。また、生殖発生毒性に関するNOELは、親動物および児動物に対し、いずれの被験物質投与群においても変化が認められなかったことから、いずれも1000 mg/kg/dayと推定した。

## 目 的

(メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドをラットに反復経口投与し、本物質の生殖毒性を検討した。

## 材料および方法

### 1. 被験物質

被験物質である(メタクリロイルオキシエチル)トリメチルアンモニウムクロリドは、水溶性のほとんど無色透明な液体で、試験には、東京化成工業株式会社(東京都中央区日本橋 4-10-2)から購入したロット番号 YOCLB (濃度 80.4 w/w%水溶液)の試薬を冷暗所(2~6℃)、密栓下で保管し、使用した。被験物質は、実験終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した(Appendix 1)。本物質の特性は、Appendix 1に示す。

被験物質の投与液は、精製水(局方、ロット番号 181680、共栄製薬株式会社)を溶媒とし、所定の投与用量となる濃度の溶液に調製した。なお、調製の際には、濃度換算を行った。調製した投与液は、1日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所(2~6℃)遮光下で密栓して保管した。冷所遮光下で7日間、その後室温遮光下で1日保管した投与液中の被験物質は、安定であることが確認された(Appendix 2)ので、調製後8日以内に使用した。初回に調製された投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した(Appendix 3)。

### 2. 動物および飼育条件

動物は、SD系 [CrI : CD(SD)]ラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター(神奈川県厚木市下古沢 795)から8週齢のものを搬入(雄55匹、雌55匹)し、12日間試験環境に馴化させた。馴化期間中に検疫および雌については10日間の性周期観察も併せて行い、発育および一般健康状態が良好で、雌では性周期に異常の認められなかったものについて、投与開始前日に体重を測定し、体重の平均値に近いものから雌雄各48匹を選び、10週齢で試験に用いた。1群の動物数は雌雄各12匹とし、無作為抽出法により群分けを行った。

投与開始時の平均体重(体重範囲)は、雄377(350~406)g、雌242(217~271)

gであった。ラットは、温度  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 10\%$ 、換気回数 10 回以上/時（オールフレッシュエア方式）、照明 12 時間/日（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）に設定したバリアシステム動物室（第 1 室）で、個体別にステンレス製金網ケージ〔260W×380D×180 H(mm)〕に收容し、これをステンレス製 5 段のラックに配置して飼育した。ただし、交尾の成立した雌は、妊娠 0 日に巣作り材料（ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社）を入れたポリカーボネート製ケージ〔265W×426D×200H(mm)〕に收容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料（固型飼料ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社、ロット番号 20100652）および飲料水（孔径  $1\mu\text{m}$  のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水）は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶（ポリカーボネートケージの場合）により、自由に摂取させた。

親動物の個体識別は耳パンチ法により行い、ラックおよびケージにはラベルを貼付した。児動物は、個体識別は行わなかった。

飼育期間中、動物室の温度は  $21.8\sim 24.3^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 47～57%の範囲で推移 (Appendix 4) した。また、飼料および巣作り材料の汚染物質の分析結果 (Appendices 5、6) はいずれも、「米国環境保護庁有害物質規制法の飼料および媒体の汚染物質限度(1979)」等を参考にして当研究所が設定した許容範囲内にあり、飲料水は水道法に基づく水質基準に適合する (Appendix 7) ことが確認された。したがって、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

### 3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

投与量設定試験として、10 週齢のラットを 1 群雌雄各 4 匹用い、100、500 および 1000 mg/kg/day で 14 日間反復経口投与した結果、一般状態、体重、摂餌量、剖検および器官重量において、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

以上のことから、本試験における投与量については、試験法ガイドラインにおける上限量の 1000 mg/kg/day を最高用量とし、以下公比 3 で 300 および 100 mg/kg/day の計 3 用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群（以下、対照群）、②被験物質の 100 mg/kg/day 投与

群 (100 mg/kg 群)、③同 300 mg/kg/day 投与群 (300 mg/kg 群)、④同 1000 mg/kg/day 投与群 (1000 mg/kg 群) の 4 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には、溶媒として用いた局方精製水を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始 14 日前から、雄は 42 日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育 4 日まで、最短 42 日～最長 46 日間、1 日 1 回、午前中 (9:02～12:00) に投与した。

#### 4. 観察および検査

##### 1) 親動物に関する項目

親動物について、次の項目を観察あるいは検査した。

##### (1) 一般状態

投与開始から解剖日まで毎日、午前と午後の 2 回、動物の生死、外観、行動等について観察した。また、妊娠、出産、哺育の状態については、注意深く観察した。

##### (2) 体重および摂餌量

体重は、雄については投与 1 (投与開始日、投与直前)、7、14、21、28、35 および 42 日、雌は投与 1、7 および 14 日、妊娠 0、7、14 および 20 日並びに哺育 0 および 4 日に、また、屠殺日にも測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて、ケージごとに翌日までの 24 時間飼料消費量を測定した。ただし、摂餌量の最終測定日は、雄では投与 41 日、雌では哺育 3 日とした。

##### (3) 雌の性周期検査

雌について、検疫・馴化期間に引き続き、投与開始日から交尾が確認されるまで、Giemsa 染色による膣垢塗抹標本作製し、鏡検により性周期段階の判定を行った。また、投与開始日から交配開始日までの性周期段階の判定から性周期を算出した。1 性周期は、発情期 (Ⅲ) 像が認められた日から次の発情期像が認められた前日までとし、発情期像が連続した場合は、最初の発情期像が認められた日から起算した。

##### (4) 交配および分娩状態観察

交配前 2 週間の投与を終了 (投与 15 日の午後) した雌雄を同一群内で 1 対 1 の組み

合わせを作り、2週間を限度として交尾が確認されるまで連続同居させた。交配期間中は毎朝一定時刻（9：30頃）に交尾の確認を行い、交尾率（%） $[(交尾動物数/同居動物数) \times 100]$ を算出した。交尾は、膣栓形成あるいは膣垢中の精子の有無により確認し、確認された日を妊娠0日とした。分娩完了の確認は、午前10時までの時点において、母動物が営巣し、授乳を開始した状態を確認すること、又は母動物の膣周囲の状態を観察し、腹部を触診することによって行った。分娩の完了が確認された日を哺育0日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について、受胎率（%） $[(受胎雌数/交尾成立雌数) \times 100]$ 、妊娠期間（妊娠0日から分娩の完了が確認された日までの日数）および出産率（%） $[(生児出産雌数/妊娠雌数) \times 100]$ を算出した。

#### (5) 剖検および器官重量

雄の計画屠殺動物は投与42日の翌日、雌は哺育5日に、それぞれエーテル麻酔下で放血屠殺し、体表、開口部粘膜および内部諸器官を肉眼的に観察した。また、各群雄全例の前立腺、精嚢（凝固腺含む）、精巣および精巣上体を秤量（絶対重量）し、屠殺日の体重に基づいて対体重比（相対重量）を算出した。なお、対器官は左右を一括して秤量した。雌については、卵巣の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率（%） $[(着床数/黄体数) \times 100]$ を算出した。

#### (6) 病理組織学検査

全例について精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣および子宮を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液（精巣、精巣上体はブアン液で前固定）で固定し、保存した。

病理組織学検査は、対照群および1000 mg/kg群の雌雄全例の精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣および子宮について実施した。精巣については、精子形成サイクル検査（ステージⅡ・Ⅲ、Ⅴ、ⅦおよびⅩⅡ）も行った。その結果、被験物質の投与による影響が雌雄ともに認められなかったため、その他の群については検査を行わなかった。また、対照群および300 mg/kg群で認められた精巣上体の結節について検査した。検査は、常法に従ってパラフィン切片を作製し、H-E染色を施して鏡検した。また、精子形成サイクル検査についてはPAS染色を行った。

### 2) 新生児に関する項目

#### (1) 産児数、性比および外表観察

分娩完了の確認後速やかに各腹の産児数（生産児と死亡児の合計）、性別（肛門と生

殖突起間距離の長短により判定) および口腔内を含む外表の異常を調べ、分娩率 (%) [ (総出産児数 / 着床数) × 100 ] を求めた。また、哺育 0 日の出産児の性比 (雄出産児数 / 雌出産児数) の性比を算出した。

#### (2) 一般状態・生児数

毎日、一般状態および生死を確認し、出生率 (%) [ (出産確認時生児数 / 総出産児数) × 100 ] および哺育 4 日生存率 (%) [ (哺育 4 日の生児数 / 出産確認時生児数) × 100 ] を算出した。

#### (3) 体重

生児について、哺育 0 日 (出生日) および 4 日 (屠殺日) に、雌雄別に腹ごとの体重を測定し、1 匹当たりの平均体重を算出した。

#### (4) 病理学検査

死亡例はその都度、生存例は哺育 4 日に二酸化炭素吸入により安楽死させ、胸部および腹部における主要器官について肉眼的に観察した。

### 5. 統計解析

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との有意差 (危険率 5% 以下) を、次の方法で検定した。なお、出産児に関するデータは、1 腹の平均を 1 標本とした。

#### (1) パラメトリックデータ

多群間の比較については、Bartlett の分散検定を行った。分散が一様な場合は一元配置の分散分析を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnnett の検定法により対照群に対する各群の比較検定を行った。分散が一様でない場合は、ノンパラメトリックデータに用いる検定法に従った (体重、体重増加量、摂餌量、器官重量、黄体数、着床数、交尾成立期間、妊娠期間、産児数、生児数、死亡児数)。

#### (2) ノンパラメトリックデータ

多群間の比較については、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnnett の検定法により対照群と各群を比較した (着床率、出生率、分娩率、性周期、新生児生存率)。2 群間の比較については、Mann-Whitney の U 検定を行った (精子形成サイクル検査)。

### (3) カテゴリカルデータ

Fisher の直接確率法を用いた（一般状態の観察および病理学検査における異常例の発現率、交尾率、受胎率、出産率）。なお、兎動物の性比については  $\chi^2$  検定を用いた。また、病理組織学検査所見のうちグレード分けしたデータについては Mann-Whitney の U 検定を用いた。

## 結 果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態および死亡 (Tables 1, 2, Appendices 8~11)

被験物質投与各群とも、投与期間を通じて一般状態の変化および死亡は認められなかった。

#### 2) 体重 (Figures 1, 2, Tables 3, 4, Appendices 12, 13)

被験物質投与各群とも、体重および体重増加量に有意な変化は認められなかった。

#### 3) 摂餌量 (Figures 3, 4, Tables 5, 6, Appendices 14, 15)

1000 mg/kg 群で雌に妊娠 7 日の摂餌量の有意な低値が認められた。雌の 100 および 300 mg/kg 群並びに雄には、有意な変化は認められなかった。

#### 4) 剖検 (Tables 7, 8, Appendices 16, 17)

対照群および 300 mg/kg 群で 12 匹中各 1 匹の雄の精巣上体に結節 (対照群 : 左側、300 mg/kg 群 : 右側) が認められた。100 および 300 mg/kg 群並びに雌では変化は認められなかった。

#### 5) 器官重量 (Table 9, Appendices 18, 19)

被験物質投与各群とも、器官重量に有意な変化は認められなかった。

#### 6) 病理組織学検査 (Tables 10, 11, Appendices 16, 17)

被験物質投与各群とも、投与に起因する変化は認められなかった。

前立腺の間質リンパ球浸潤が対照群で 3 例認められた。剖検時に対照群および 300 mg/kg 群で 1 例ずつ認められた精巣上体の結節は、精子肉芽腫 (片側性) であった。精子形成サイクル検査では、各検査ステージに有意な変化は認められなかった。

### 2. 生殖発生毒性

#### 1) 親動物に及ぼす影響

(1) 性周期検査 (Table 12、 Appendices 20, 21)

被験物質投与各群とも、平均性周期に有意な変化は認められなかった。

(2) 交尾率および受胎率 (Table 12、 Appendix 22)

被験物質投与各群とも、交尾成立までに要する日数、交尾率および受胎率に有意な変化は認められなかった。

(3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 12、 Appendix 22)

被験物質投与各群とも、黄体数、着床数および着床率に有意な変化は認められなかった。

(4) 妊娠期間および出産率 (Table 12、 Appendix 22)

被験物質投与各群とも、妊娠期間および出産率に有意な変化は認められなかった。

(5) 分娩および哺育状態 (Table 12、 Appendix 22)

被験物質投与各群とも、分娩および哺育状態に異常は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 13、 Appendix 23)

被験物質投与各群とも、一腹当たりの総出産児数、生児数、体重、分娩率、出生率、生存率および性比に有意な変化は認められず、また、新生児の一般状態に異常は認められなかった。

(2) 病理学検査 (Table 14、 15、 Appendices 24, 25)

外表検査では、いずれの投与群においても異常は認められなかった。内臓検査においても、いずれの投与群とも異常は認められなかった。内臓変異として、胸腺の頸部残留を呈する児動物が対照群で 1 匹(発現率 0.5%)および 100 mg/kg 群で 1 匹(0.6%)、尿管の拡張および屈曲を呈する児動物が 300 mg/kg 群で 1 匹 (0.5%)、尿管の屈曲を呈する児動物が対照群で 2 匹 (1.5%)、左臍動脈遺残を呈する児動物が 1000 mg/kg で 1 匹 (0.5%) 認められた。

## 考 察

### 1. 反復投与毒性について

(メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドの反復投与毒性については、ラットへの 28 日間反復経口投与毒性試験において、1000 mg/kg/day で雌雄とも一部の例で投与期間中、一過性に排便量の減少および軽度な体重の増加抑制が認められたが、これら以外には生体の機能および形態の明らかな変化はなく、毒性影響は認められなかったと報告されている<sup>2)</sup>。

本試験においては、1000 mg/kg 群の雌で妊娠 7 日にのみ摂餌量の有意な低値が認められたが、ごく軽度な変化であり、また、体重に有意な変化は認められず、毒性影響と判断されるものではなかった。また、一般状態、剖検、器官重量および病理組織学検査においても毒性影響と判断される変化は認められなかった。

なお、300 mg/kg 群で認められた精巣上体における精子肉芽腫は、1 例のみの発現であり、また、ラットにおける自然発生病変として発現する変化<sup>3)</sup>でもあることから、被験物質の投与とは無関係な偶発的所見と判断された。

### 2. 生殖発生毒性について

雌雄親動物の生殖能に対しては、検査した各指標に有意な変化は認められず、また、雌雄の生殖器官にも病理学的変化は認められなかった。

児の発生に対しても、検査した各指標に有意な変化は認められなかった。

なお、被験物質投与各群で内臓変異を呈する児動物が認められたが、いずれも低い発現率であり、用量相関的な増加傾向もないことから、自然発生的範疇<sup>4)</sup>の変化と判断された。

以上の結果から、(メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドの親動物への反復投与において、いずれの被験物質投与群においても毒性影響は認められなかったことから、反復投与毒性における無影響量 (NOEL) は雌雄ともに 1000 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL は、親動物および児動物に対し、いずれの被験物質投与群においても変化が認められなかったことから、いずれも 1000 mg/kg/day と推定した。

文 献

- 1) “12394 の化学商品”, 化学工業日報社, 1994.
- 2) ██████████ (メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, 化学物質毒性試験報告, **8**, 991-1005, 2001.
- 3) 日本毒性病理学会編, “毒性病理学”, 日本毒性病理学会, 名古屋, 2000.
- 4) Morita, H. , et al, (1987). Spontaneous malformations in laboratory animals. Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice, *Cong. Anom.*, **27**, 147-206.

(メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドの  
ラットを用いる簡易生殖毒性試験

(試験番号：10-035)

## 最終報告書 添付資料A

(図・群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

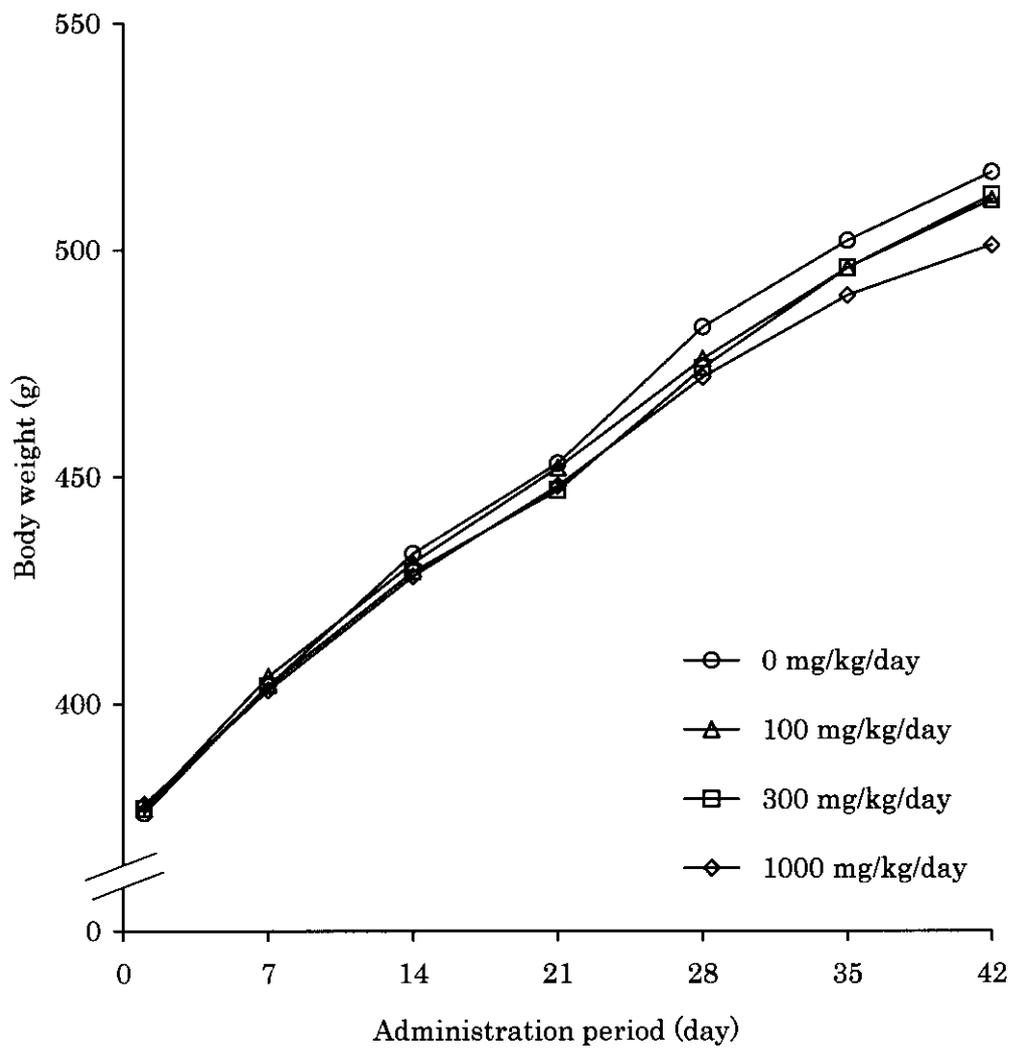


Fig.1 Body weight changes of male rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

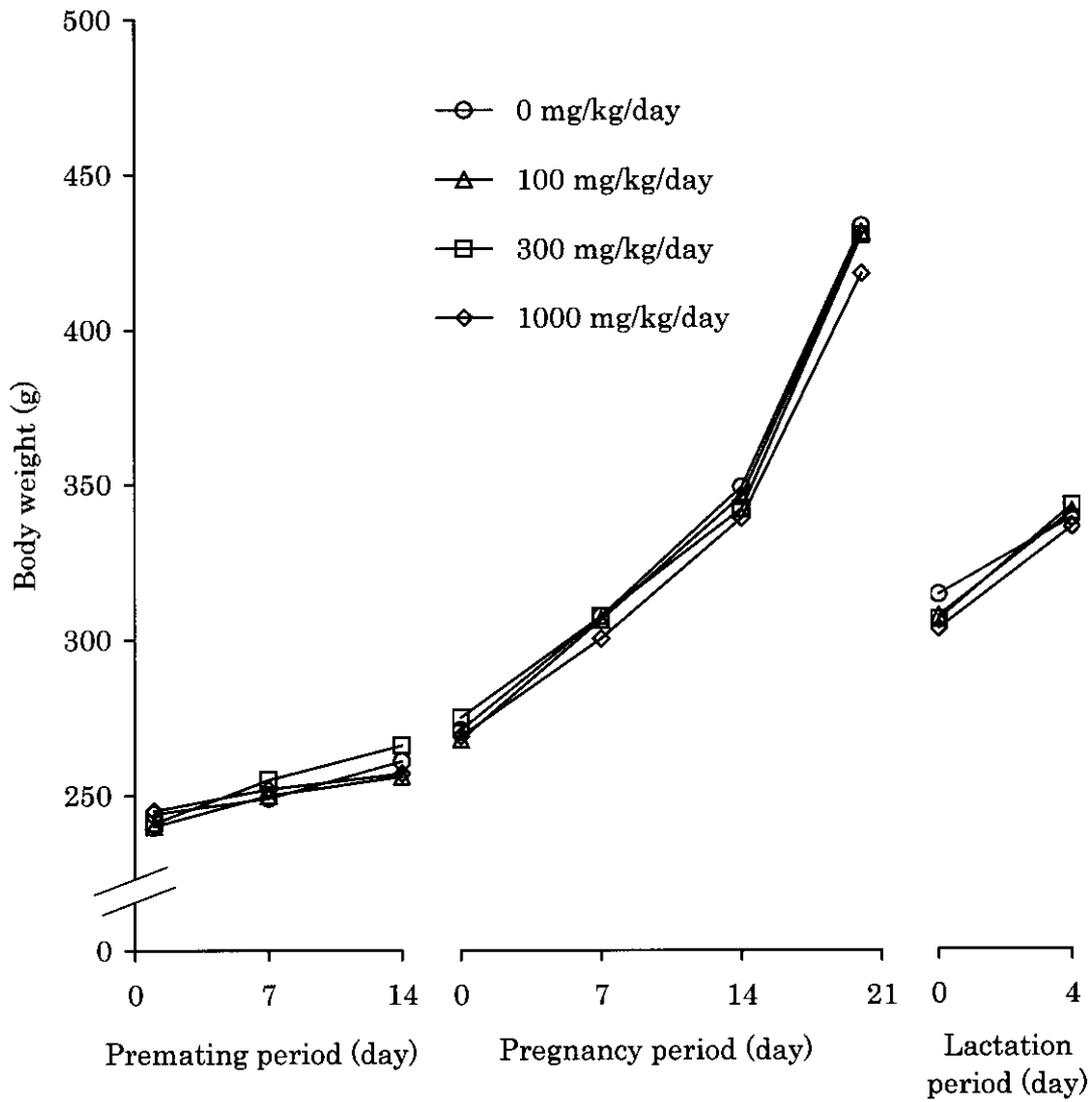


Fig.2 Body weight changes of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

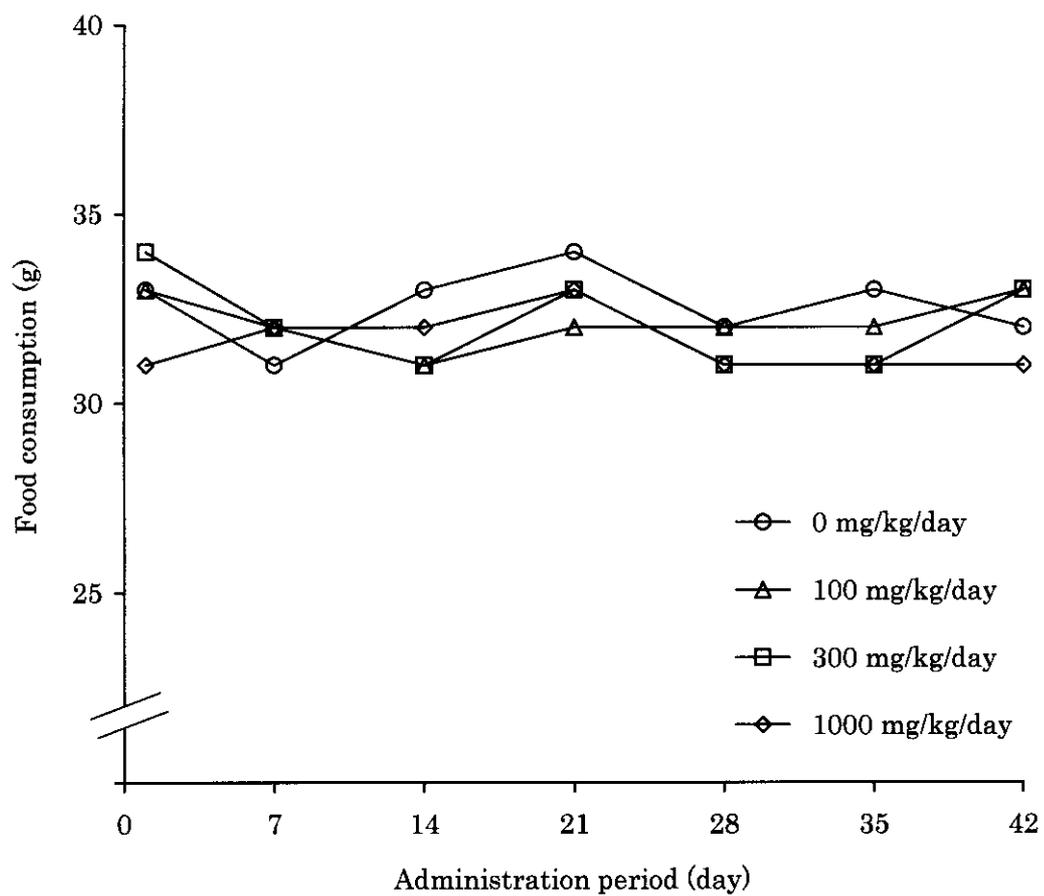


Fig.3 Food consumption of male rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

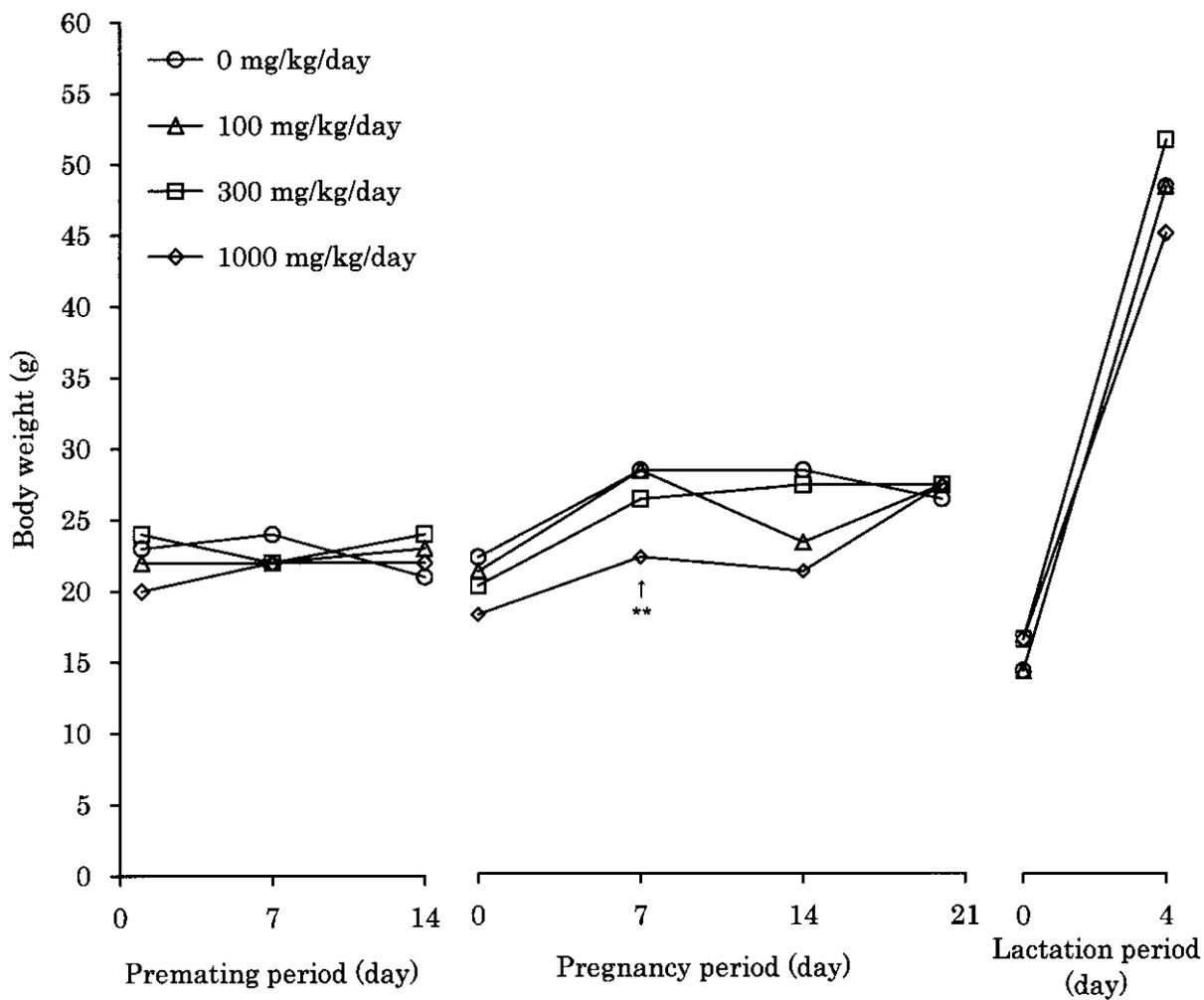


Fig.4 Food consumption of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium in the reproduction/developmental toxicity screening test

Table 1 Clinical signs and mortality rate of male rats treated orally with (2-methylpropenoxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)	0	100	300	1000
	No. of animals	12	12	12	12
General conditions					
Abnormality		0	0	0	0
Mortality (%)					
		0	0	0	0

Table 2 Clinical signs and mortality rate of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

General conditions	Dose (mg/kg/day) No. of animals	<u>0</u> 12	<u>100</u> 12	<u>300</u> 12	<u>1000</u> 12
General conditions					
Abnormality		0	0	0	0
Mortality (%)		0	0	0	0

Table 3 Body weights of male rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Day	Administration period							Gain 1~42
		1	7	14	21	28	35	42	
0		376	404	433	453	483	502	517	141
		± 18	± 20	± 26	± 27	± 35	± 37	± 39	± 26
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
100		377	406	431	452	476	496	511	134
		± 15	± 18	± 18	± 21	± 23	± 27	± 31	± 20
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
300		377	404	429	447	474	496	512	136
		± 13	± 18	± 24	± 26	± 30	± 33	± 35	± 23
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
1000		378	403	428	448	472	490	501	123
		± 15	± 18	± 18	± 19	± 21	± 24	± 30	± 23
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals

Table 4 Body weights of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	(g)											
	Premating period				Pregnancy period					Lactation period		
	Day	1	7	14	Gain		0	7	14	20	Gain	
				1~14					0~20	0	4	0~4
0	244	249	261	18	270	306	347	430	160	316	341	25
	± 10	± 9	± 13	± 9	± 13	± 13	± 14	± 22	± 15	± 23	± 10	± 24
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
100	240	250	256	16	267	305	344	428	161	309	343	35
	± 12	± 13	± 16	± 10	± 15	± 17	± 19	± 27	± 19	± 21	± 19	± 10
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
300	241	255	266	26	274	306	340	427	154	308	345	38
	± 12	± 9	± 8	± 7	± 12	± 11	± 16	± 25	± 23	± 22	± 20	± 12
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
1000	245	252	257	12	268	299	337	415	146	305	338	33
	± 11	± 12	± 16	± 8	± 13	± 17	± 23	± 28	± 24	± 26	± 25	± 12
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals

Table 5 Food consumption of male rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Day	Administration period (g/rat/day)						
		1	7	14	21	28	35	41
0		33	31	33	34	32	33	32
		± 3	± 2	± 2	± 3	± 3	± 3	± 2
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
100		33	32	31	32	32	32	33
		± 3	± 4	± 5	± 2	± 2	± 3	± 3
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
300		34	32	31	33	31	31	33
		± 2	± 3	± 3	± 3	± 3	± 3	± 2
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
1000		31	32	32	33	31	31	31
		± 3	± 2	± 3	± 3	± 3	± 4	± 4
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)

Each value is expressed as mean±S.D.  
(n) : No. of animals

Table 6 Food consumption of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Day	Premating period			Pregnancy period				Lactation period	
		1	7	14	0	7	14	20	0	3
0		23	24	21	22	28	28	26	23	54
		± 3	± 4	± 3	± 3	± 2	± 2	± 9	± 5	± 12
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
100		22	22	23	21	28	23	27	23	54
		± 5	± 3	± 2	± 3	± 3	± 9	± 3	± 3	± 5
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
300		24	22	24	20	26	27	27	25	57
		± 2	± 4	± 3	± 4	± 4	± 9	± 3	± 5	± 11
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
1000		20	22	22	18	22 **	21	27	25	51
		± 5	± 2	± 2	± 3	± 5	± 9	± 4	± 8	± 7
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals

\*\* : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 7 Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0	100	300	1000
				Fate	KD	KD	KD
			No.of animals	12	12	12	12
Epididymis	: Nodule	+		1	0	1	0

KD : Killed by design after administration period.

+ : Slight.

Table 8 Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0	100	300	1000
			Fate	KD	KD	KD	KD
			No.of animals	12	12	12	12
Abnormality				0	0	0	0

KD : Killed by design after administration period.

Table 9 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with (2-methylpropronyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	B.W. (g)	Prostate (g)	Seminal vesicle (g)	Testis (g)	Epididymis (g)
Absolute	0	12	482 ±37	0.70 ±0.25	2.31 ±0.32	3.38 ±0.24	1.44 ±0.13
	100	12	482 ±28	0.74 ±0.20	2.29 ±0.36	3.40 ±0.23	1.46 ±0.16
	300	12	476 ±31	0.80 ±0.21	2.15 ±0.26	3.34 ±0.29	1.40 ±0.10
	1000	12	468 ±24	0.74 ±0.16	2.29 ±0.17	3.37 ±0.25	1.38 ±0.11
Relative @	0	12	482 ±37	0.15 ±0.06	0.48 ±0.07	0.70 ±0.05	0.30 ±0.03
	100	12	482 ±28	0.15 ±0.04	0.48 ±0.09	0.71 ±0.06	0.31 ±0.04
	300	12	476 ±31	0.17 ±0.04	0.45 ±0.06	0.70 ±0.06	0.30 ±0.03
	1000	12	468 ±24	0.16 ±0.03	0.49 ±0.04	0.72 ±0.06	0.30 ±0.02

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

Table 10-1 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0	100	300	1000
			Fate	KD	KD	KD	KD
			No.of animals	12	12	12	12
Prostate	: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	+		3	#	#	0
Epididymis	: Spermatic granuloma	+		1	#	1/1 <sup>a</sup>	0

KD : Killed by design after administration period.

Organs of the testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined for males of control and 1000 mg/kg groups.

a : Examined the animal with a macroscopic abnormality.

+ : Slight.

# : Not examined.

Table 10-2 The number of cells in seminiferous epithelia assessed by the individual examination in male rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	No. of animals		Stage II-III			Stage V			Stage VII			Stage X II	
			G	P	T	G	P	T	G	R/P	T	G	Z/P
0	12	Mean	0.47	1.84	6.06	0.60	1.89	6.07	0.06	3.05	6.20	0.06	4.37
		S.D.	0.04	0.17	0.57	0.05	0.11	0.34	0.01	0.25	0.59	0.01	0.25
1000	12	Mean	0.45	1.76	6.06	0.59	1.84	6.24	0.06	3.02	6.26	0.06	4.28
		S.D.	0.04	0.11	0.39	0.03	0.14	0.29	0.01	0.22	0.22	0.01	0.36

G : spermatogonia.  
P : pachytene spermatocyte.  
R : preleptotene spermatocyte.  
Z : zygotene spermatocyte.  
T : round spermatid.

Table 11 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0	100	300	1000
				Fate	KD	KD	KD
		No.of animals		12	12	12	12
Abnormality				0	#	#	0

KD : Killed by design after administration period.

Organs of the ovary and uterus were examined for females of control and 1000 mg/kg groups.

# : Not examined.

Table 12 Reproduction results of rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	100	300	1000
Estrous cycle (days, Mean $\pm$ S.D.)	4.2 $\pm$ 0.4 (0/12) <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.4 (0/12)	4.0 $\pm$ 0.0 (0/12)	4.2 $\pm$ 0.5 (0/12)
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs with successful copulation	12	12	12	12
Copulation index (%)	100	100	100	100
Pairing days until copulation (days, Mean $\pm$ S.D.)	2.6 $\pm$ 1.4	2.3 $\pm$ 1.0	2.0 $\pm$ 1.1	2.8 $\pm$ 1.0
No. of pregnant females	12	12	12	12
Fertility index (%)	100	100	100	100
No. of corpora lutea (Mean $\pm$ S.D.)	16.3 $\pm$ 1.6	16.3 $\pm$ 1.1	15.8 $\pm$ 0.8	16.3 $\pm$ 1.5
No. of implantation sites (Mean $\pm$ S.D.)	15.5 $\pm$ 2.2	15.7 $\pm$ 1.3	15.5 $\pm$ 0.9	15.6 $\pm$ 1.6
Implantation index (%, Mean $\pm$ S.D.)	95.2 $\pm$ 8.4	96.5 $\pm$ 5.6	97.9 $\pm$ 3.1	96.1 $\pm$ 7.2
No. of pregnant females with parturition	12	12	12	12
Gestation length (days, Mean $\pm$ S.D.)	22.3 $\pm$ 0.5	22.5 $\pm$ 0.5	22.5 $\pm$ 0.5	22.2 $\pm$ 0.4
No. of pregnant females with live pups	12	12	12	12
Gestation index (%)	100	100	100	100
No. of pregnant females with live pups on day 4	12	12	12	12

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)  $\times$  100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)  $\times$  100.

Gestation index = (No. of females with live pups/No. of pregnant females)  $\times$  100.

a : (No. of females with disorder of estrous cycle/No. of females).

Table 13 Litter results of rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	100	300	1000
No. of pups born	14.6 ± 2.5	14.8 ± 1.4	14.9 ± 1.6	14.8 ± 1.7
Delivery index (%)	93.9 ± 7.0	94.4 ± 8.0	96.1 ± 6.0	95.2 ± 6.1
No. of pups alive on day 0 of lactation				
Total	14.5 ± 2.6	14.8 ± 1.4	14.9 ± 1.6	14.7 ± 1.8
Male	7.4 ± 2.1	6.9 ± 2.9	6.8 ± 2.2	7.4 ± 1.9
Female	7.1 ± 1.7	7.8 ± 2.7	8.2 ± 2.3	7.3 ± 1.9
Live birth index (%)	99.4 ± 2.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	98.9 ± 2.7
Sex ratio(Male/Female)	1.06	0.88	0.83	1.02
No. of pups alive on day 4 of lactation				
Total	14.4 ± 2.5	14.7 ± 1.4	14.6 ± 1.6	14.4 ± 1.8
Male	7.3 ± 1.9	6.8 ± 2.9	6.7 ± 2.1	7.3 ± 1.9
Female	7.1 ± 1.7	7.8 ± 2.7	7.9 ± 2.4	7.2 ± 1.9
Viability index (%)	99.5 ± 1.6	99.4 ± 1.9	97.8 ± 4.5	98.4 ± 3.0
Body weight of live pups (g)				
on day 0				
Male	7.0 ± 0.7	6.7 ± 0.6	7.1 ± 0.8	6.8 ± 0.7
Female	6.6 ± 0.7	6.5 ± 0.5	6.6 ± 0.7	6.4 ± 0.6
on day 4				
Male	11.3 ± 1.6	10.7 ± 1.1	11.5 ± 1.8	10.5 ± 1.1
Female	10.7 ± 1.5	10.4 ± 0.9	10.9 ± 1.5	10.0 ± 1.1

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.

Sex ratio = Total number of male pups/Total number of female pups.

Each value is expressed as Mean±S.D.,except sex ratio.

Table 14 External findings of pups from pregnant rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	100	300	1000
No. of pups examined	175	177	175	176
No. of pups with external malformations <sup>#</sup>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

# : No. of pups (Mean±S.D. of individual litter percentages).

Table 15 Visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	100	300	1000
No. of pups examined	175	177	175	176
No. of pups with visceral malformations <sup>#</sup>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No. of pups with visceral variations <sup>#</sup>	3 (2.0±4.6)	1 (0.6±1.9)	1 (0.5±1.7)	1 (0.5±1.8)
Visceral variations <sup>#</sup>				
Thymic remnant in neck	1 (0.5±1.8)	1 (0.6±1.9)	0 (0)	0 (0)
Dilatation of ureter	0 (0)	0 (0)	1 (0.5±1.7)	0 (0)
Bending of ureter	2 (1.5±3.5)	0 (0)	1 (0.5±1.7)	0 (0)
Persistent left umbilical artery	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5±1.8)

# : No. of pups (Mean±S.D. of individual litter percentages).

(メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリドの  
ラットを用いる簡易生殖毒性試験

(試験番号：10-035)

## 最終報告書 添付資料B

(個別別表等)

## Appendix 1 Test item characterization

### 被験物質の特性

名 称： (メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリド  
英名： (2-Methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride  
別 名： Ethanaminium, *N,N,N*-trimethyl-2-((2-methyl-1-oxo-2-propenyl)oxy)-, chloride  
CAS 番号： 5039-78-1  
ロット番号： YOCLB  
濃 度： 80.4 w/w%水溶液 [他は水とヒドロキノンモノメチルエーテル(安定剤)：2000 ppm を含む、東京化成工業株式会社 (東京都中央区日本橋 4-10-2) からの情報]

入 手 先： [redacted] から試薬を購入

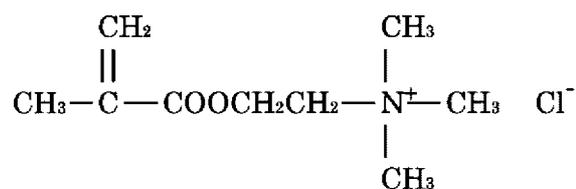
入手日・量： 平成 22 年 6 月 9 日 (1500 g)

### 物 性 等：

化学名 (メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリド

分子式  $C_9H_{18}ClNO_2$

構造式



分子量 207.70

性状 (常温) ほとんど無色透明液体

比重 1.12

溶解性 水に易溶

安 定 性 安定 [実験終了後、残余被験物質を分析 (2010 年 11 月 24 日： [redacted] [redacted] 電位差滴定法：沈殿滴定) した結果、濃度は 80.2 w/w%であり、安定であったことを確認した。]

保管条件 冷暗所 (2~6°C)、密栓

## Appendix 2 Stability of the test article in the dosing solutions

### 被験物質の投与形態での安定性

(メタクリロイルオキシエチル)トリメチルアンモニウムクロリドのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験を実施するに当たり、被験物質の投与形態での安定性を調べるため、溶媒として精製水（局方、ロット番号 181680、共栄製薬株式会社）を用いて（メタクリロイルオキシエチル）トリメチルアンモニウムクロリド（ロット番号：YOCLB）の 0.2%濃度および 20%濃度の溶解液を調製し、調製直後および調製後冷所（2～6℃）、遮光下で 7 日保存後、それぞれ室温・遮光下で 1 日保存したものについて上、中および下層よりサンプリングし、濃度を分析（電位差滴定法）した。得られた結果は、次表に示す。

調製濃度 (%)	分析時点	分析値 (%)				変動係数 (%)
		上層	中層	下層	平均値	
0.2	調製直後	0.20	0.20	0.20	0.20	0
	8 日後	0.20	0.20	0.20	0.20	0
20	調製直後	19.8	20.0	20.0	19.9	0.6
	8 日後	20.0	20.1	20.1	20.1	0.3

以上の結果から、精製水に溶解した（メタクリロイルオキシエチル）トリメチルアンモニウムクロリドは、冷所（2～6℃）で 7 日保存後、室温・遮光下で 1 日保存した場合において、均一、かつ安定であることが確認された。

### Appendix 3 Analysis of concentrations of the test article in the dosing solutions

#### 投与液中の被験物質濃度の確認

(メタクリロイルオキシエチル)トリメチルアンモニウムクロリドのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験のための被験物質投与液について、所定の濃度で調製されていることを確認するため、初回に調製された(メタクリロイルオキシエチル)トリメチルアンモニウムクロリドの精製水による溶液(100 mg/kg 群用: 20 mg/mL、300 mg/kg 群用: 60 mg/mL および 1000 mg/kg 群用: 200 mg/mL)について、それぞれ3反復分析(電位差滴定法)した。得られた結果は、次表に示す。

調製濃度 (mg/mL)	分析値 (mg/mL)			
	上層	中層	下層	平均値
20	20.1	20.1	20.2	20.1
60	60.2	60.2	60.4	60.3
200	198.6	199.7	199.9	199.4

以上の結果から、被験物質投与液は、所定の濃度で調製されていることが確認された。

Appendix 4-1 Environmental conditions of animal room

Result of temperature and relative humidity at animal room No.1

Date	Temperature(°C)	Humidity(%)	Note
2010/8/19	22.2 - 23.2	51 - 53	Arrival of animals
2010/8/20	22.6 - 23.1	51 - 54	
2010/8/21	23.1 - 23.5	50 - 53	
2010/8/22	22.9 - 23.8	50 - 54	Start of the examination of estrous cycle
2010/8/23	23.0 - 24.1	49 - 53	
2010/8/24	23.0 - 24.1	49 - 52	
2010/8/25	23.1 - 24.1	49 - 52	
2010/8/26	23.1 - 24.2	49 - 52	
2010/8/27	23.1 - 24.1	48 - 51	
2010/8/28	23.1 - 24.0	49 - 51	
2010/8/29	22.9 - 23.9	49 - 51	
2010/8/30	22.9 - 24.0	49 - 52	
2010/8/31	23.2 - 24.0	50 - 55	Grouping
2010/9/1	23.0 - 24.1	48 - 51	Start of administration
2010/9/2	23.0 - 24.0	49 - 51	
2010/9/3	23.0 - 24.0	48 - 52	
2010/9/4	23.2 - 24.3	47 - 51	
2010/9/5	23.2 - 24.1	48 - 51	
2010/9/6	23.0 - 24.1	49 - 51	
2010/9/7	22.9 - 24.1	49 - 51	
2010/9/8	22.9 - 23.2	51	
2010/9/9	22.1 - 23.0	52 - 53	
2010/9/10	22.3 - 23.3	51 - 54	
2010/9/11	22.5 - 23.5	51 - 54	
2010/9/12	22.8 - 23.6	51 - 53	
2010/9/13	22.9 - 23.8	50 - 53	
2010/9/14	23.0 - 23.6	51 - 53	
2010/9/15	22.5 - 23.1	53	Start of mating
2010/9/16	22.2 - 23.0	52 - 53	
2010/9/17	22.4 - 23.0	52 - 57	
2010/9/18	22.3 - 22.9	52 - 54	

Appendix 4-2 Environmental conditions of animal room

Result of temperature and relative humidity at animal room No.1

Date	Temperature(°C)	Humidity(%)	Note
2010/9/19	22.3 - 23.0	52 - 55	
2010/9/20	22.3 - 22.8	53 - 55	
2010/9/21	22.2 - 23.2	52 - 55	
2010/9/22	22.4 - 23.6	51 - 54	
2010/9/23	22.1 - 22.7	53 - 55	
2010/9/24	22.3 - 22.6	52 - 54	
2010/9/25	21.9 - 23.0	55	
2010/9/26	21.8 - 22.3	50 - 56	
2010/9/27	22.1 - 22.2	55 - 56	
2010/9/28	22.2 - 22.7	55 - 57	
2010/9/29	22.1 - 22.7	54 - 56	End of mating
2010/9/30	21.9 - 22.4	54 - 55	
2010/10/1	22.2 - 22.5	54 - 55	
2010/10/2	22.3	55 - 56	
2010/10/3	22.3 - 22.4	55 - 56	
2010/10/4	22.1 - 22.5	54 - 55	
2010/10/5	22.4 - 22.6	54 - 55	
2010/10/6	22.2 - 23.1	55 - 57	
2010/10/7	22.4 - 22.6	54 - 55	
2010/10/8	22.2 - 22.6	54 - 56	
2010/10/9	22.4 - 23.0	53 - 57	
2010/10/10	22.1 - 22.8	54 - 56	
2010/10/11	22.6 - 22.8	54 - 56	
2010/10/12	22.0 - 22.8	55 - 56	
2010/10/13	22.1 - 22.4	54 - 57	Necropsy of males Necropsy of females
2010/10/14	22.2 - 22.6	53 - 55	
2010/10/15	22.0 - 22.1	54 - 55	
2010/10/16	22.1 - 22.2	53	
2010/10/17	22.4 - 22.5	52 - 54	

## Appendix 5-1 Analysis of contaminants in animal feed

### TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences  
IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Minonobashi hakozaeki-cho Chuo-ku Tokyo 103-0015 JAPAN  
TEL 03-56331983 FAX 03-56631985

Date : June 28, 2010

#### CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K  
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100652  
Date of Application : June 7, 2010  
Date of Examination : June 7, 2010 ~ June 28, 2010  
Examination No. : 261006-0010

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on June 7, 2010, we herewith report as follows :

#### RESULTS

Aflatoxin B <sub>1</sub>	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin B <sub>2</sub>	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G <sub>1</sub>	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G <sub>2</sub>	not detected	(detection limit 5 ppb)
Arsenic(As)	0.09 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Lead(Pb)	0.2 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Cadmium(Cd)	0.07 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Chromium(Cr)	0.5 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Mercury(Hg)	0.01 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Polychlorinatedbiphenyl(PCBs)	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Total BHC* <sup>1</sup>	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Parathion	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Malathion	0.08 ppm	(detection limit 0.05 ppm)
Total DDT* <sup>2</sup>	not detected	(detection limit 0.05 ppm)

\*<sup>1</sup> Expressed as total amounts of  $\alpha$ -BHC,  $\beta$ -BHC,  $\gamma$ -BHC and  $\delta$ -BHC

\*<sup>2</sup> Expressed as total amounts of *op*'-DDT, *pp*'-DDT, *op*'-DDD, *pp*'-DDD, *op*'-DDE and *pp*'-DDE

continued.

Appendix 5-2 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences

IMAS-HAKOZAKI BLDG. 4F. 1-10-3 HONKASHI NAKOZAKI-CHO. INOUE-KU. TOKYO 103-0045 JAPAN

TEL. 03-5667-9667 FAX. 003-5667-9688

Heptachlor .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Dieldrin .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Aldrin .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
N-Nitrosodiethylamine .....	not detected	(detection limit 10 ppb)
N-Nitrosodimethylamine .....	not detected	(detection limit 10 ppb)



Director  
Institute for Food and Environment Sciences  
TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Appendix 5-3 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences  
IMAS-HAKOZAKI BLDG 4-1-1, Nishinagasaki 4-chome Chuo-Ku Tokyo 100-0015 JAPAN  
TEL 03(2662)9661 FAX 03(2662)9652

Date : June 28, 2010

CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K  
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100652  
Date of Application : June 7, 2010  
Date of Examination : June 7, 2010 ~ June 28, 2010  
Examination No. : 261006-0011

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on June 7, 2010, we herewith report as follows :

RESULT

Selenium(Se) ..... 0.4 ppm (detection limit 0.1 ppm)



Director  
Institute for Food and Environment Sciences  
TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

**NOSAN**

DATE Jun 7, 2010

MICROBIOLOGICAL INSPECTION

Customer  
RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE  
IN BIOCHEMISTRY AND TOXICOLOGY  
Sample Designation  
LABO MR STOCK  
Lot No.20100652

S.P.C. .... 7.9×10<sup>3</sup> CFU/g  
Coliform Group ..... Negative  
Salmonella ..... Negative  
Molds ..... <20 CFU/g

NOSAN CORPORATION  
R & D Center  
Veterinary & Hygiene Service Group  
5246 TAKURA, TSUKUBASHI, 300-2615 JAPAN



Director

Appendix 6-1 Analysis of contaminants in wood chips for mating nest



分析レポートコード AR-10-JP-001104-01



ユーロフィンスオーダーコード EUJPTC-00000951

報告日 22.10.2010

日本チベールス

受領



## 分析報告書

サンプルコード: 257-2010-10000007      分析      05.10.2010 - 19.10.2010  
 顧客コード: ホワイトブレーク

分析	結果	単位	定量限界
J8312 ヒ素 (Asとして) ヒ素	<0.10	ppm	0.10
J8308 カドミウム カドミウム	0.28	ppm	0.01
J8306 鉛 鉛	0.14	ppm	0.05
JCHG2 総水銀 総水銀	<0.005	ppm	0.005
JJ006 アフラトキシン B1, B2, G1, G2 アフラトキシン B1	0.1	ppb	0.1
アフラトキシン B2	<0.1	ppb	0.1
アフラトキシン G1	<0.1	ppb	0.1
アフラトキシン G2	<0.1	ppb	0.1
UMUP8 酵母およびカビ カビ	< 10	cfu/g	<10
UMUDN 一般細菌数 (生菌数) 一般細菌数 (30° C)	< 10	cfu/g	<10
UMTK8 サルモネラ サルモネラ	陰性	/25 g	
UMULP 大腸菌 大腸菌	陰性	cfu/g	

報告結果の再生については分析所の許可が必要となります。報告結果は、分析したサンプルのみには適用されます。  
 Eurofins Analytics K.K Nitsa Keihin-Jima Center New Bldg. 2F 3-5-5 Keihin-Jima Ota-Ku 143-0003 Tokyo - JAPAN  
 ページ 1/2

Appendix 6-2 Analysis of contaminants in wood chips for mating nest



分析レポートコード AR-10-JP-001104-01



ユーロフィンスオーダーコード EUJPTO-00000951

<b>J3246 乾燥減量</b>			
含水量	9.5 %		0.1
<b>SP001 ビスロイドを含む有機塩素系農薬</b>			
γ-BHC (リンデン)	<0.001 ppm		0.001
DDT 及び代謝物 (総計)	<0.01 ppm		
DDT, p,p'	<0.001 ppm		0.001
DDT, o,p'	<0.001 ppm		0.001
DDE, p,p'	<0.002 ppm		0.002
DDE, o,p'	<0.002 ppm		0.002
DDD, p,p'	<0.002 ppm		0.002
DDD, o,p'	<0.002 ppm		0.002
エンドリン	<0.002 ppm		0.002
ディルドリン	<0.001 ppm		0.001
アルドリン	<0.001 ppm		0.001
ヘプタクロル	<0.001 ppm		0.001
<b>SP004 有機リン系農薬</b>			
パラチオン	<0.01 ppm		0.01
ダイアジノン	<0.01 ppm		0.01
マラチオン (マラソン)	<0.01 ppm		0.01
パラチオンメチル	<0.01 ppm		0.01
<b>SP103 ポリ塩化ビフェニル</b>			
7 PCB 測定総計	<0.07 ppm		
PCB IUPAC 28	<0.01 ppm		0.01
PCB IUPAC 52	<0.01 ppm		0.01
PCB IUPAC 101	<0.01 ppm		0.01
PCB IUPAC 118	<0.01 ppm		0.01
PCB IUPAC 138	<0.01 ppm		0.01
PCB IUPAC 153	<0.01 ppm		0.01
PCB IUPAC 180	<0.01 ppm		0.01

Chemistry Customer Services Manager

報告結果の再生については分析所の許可が必要となります。報告結果は、分析したサンプルのみに適用されます。  
Eurofins Analytics K.K Nittsu Keihin-Jima Center New Bldg. 2F 3-5-5 Keihin-Jima Ota-Ku 143-0003 Tokyo - JAPAN  
ページ 2/2

## Appendix 7 Analysis of contaminants in drinking water

### Analytical Certificate of Tap water

Issue No. D-100194  
Date: 2. Aug. 2010

Messrs. RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE IN BIOCHEMISTRY & TOXICOLOGY

TOKYO [REDACTED] SERVICE Co.,Ltd  
8-Chome [REDACTED] Edogawa-ku Tokyo  
Tel: 03 [REDACTED] 03(3877)5388  
Registered [REDACTED] 20.3 of the waterworks law  
Registered [REDACTED] water-327  
(Analytical [REDACTED] in buil. facilities)

Director of analysis : [REDACTED]  
Sampling by : [REDACTED]

Sample: Tap water  
Sampling spot: Clean room  
Date of sampling: 20. Jul. 2010  
Purpose of analysis: Suitability inspection according to the  
Criteria of the Waterworks Law  
(15Items + 12Sterilizing byproducts)

No.	Items	Unit	Results	Criteria
1	Bacteria	count/ml	0	less than 100
2	Coliform count	—	Non-detected	Non-detected
3	Nitrogen (as nitrite&nitrate)	mg/l	1.2	less than 10
4	Chloride ion	mg/l	9.5	less than 200
5	Organic substance (Total Organic Carbon)	mg/l	0.5	less than 3
6	p H	—	7.5	5.8~8.6
7	Taste	—	normal	Not abnormal
8	Odor	—	normal	Not abnormal
9	Degree of Color	degree	2	less than 5
10	Turbidity	degree	Below 1	less than 2
11	Lead and its compound	mg/l	Below 0.001	less than 0.01
12	Zinc and its compound	mg/l	Below 0.1	less than 1.0
13	Iron and its compound	mg/l	0.04	less than 0.3
14	Copper and its compound	mg/l	Below 0.1	less than 1.0
15	Distillation residue	mg/l	120	less than 500
16	Chloroform	mg/l	0.011	less than 0.06
17	Bromo-dichloromethane	mg/l	0.0032	less than 0.03
18	Dibromo-chloromethane	mg/l	Below 0.001	less than 0.1
19	Bromoform	mg/l	Below 0.0009	less than 0.09
20	Tri-halomethane	mg/l	0.016	less than 0.1
21	Cyanide ion and cyanchloride	mg/l	Below 0.001	less than 0.01
22	Bromic acid	mg/l	Below 0.001	less than 0.01
23	Chloro-acetic acid	mg/l	Below 0.002	less than 0.02
24	Dichloro-acetic acid	mg/l	Below 0.004	less than 0.04
25	Tri-chloro-acetic acid	mg/l	Below 0.02	less than 0.2
26	Formaldehyde	mg/l	Below 0.008	less than 0.08
27	Chloric acid	mg/l	Below 0.06	less than 0.6

Methods of analysis are based on The Ministry of Health and Welfare Order No.101(30.May.2003)  
The result of above-mentioned items of tap water suits the criteria of the Waterworks Law

Appendix 8-1 Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

(0 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
001																
002																
003																
004																
005																
006																
007																
008																
009																
010																
011																
012																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
001																
002																
003																
004																
005																
006																
007																
008																
009																
010																
011																
012																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration											
	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
001											TK	
002											TK	
003											TK	
004											TK	
005											TK	
006											TK	
007											TK	
008											TK	
009											TK	
010											TK	
011											TK	
012											TK	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

TK : Terminal killing. A : Cumulative number of dead animals. B : Mortality rate (%).

## Appendix 8·2

Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

(100 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
013																
014																
015																
016																
017																
018																
019																
020																
021																
022																
023																
024																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
013																
014																
015																
016																
017																
018																
019																
020																
021																
022																
023																
024																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration											
	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
013											TK	
014											TK	
015											TK	
016											TK	
017											TK	
018											TK	
019											TK	
020											TK	
021											TK	
022											TK	
023											TK	
024											TK	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

TK : Terminal killing.

A : Cumulative number of dead animals.

B : Mortality rate (%).

## Appendix 8-3

Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

(300 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
025																
026																
027																
028																
029																
030																
031																
032																
033																
034																
035																
036																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
025																
026																
027																
028																
029																
030																
031																
032																
033																
034																
035																
036																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration											
	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
025											TK	
026											TK	
027											TK	
028											TK	
029											TK	
030											TK	
031											TK	
032											TK	
033											TK	
034											TK	
035											TK	
036											TK	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

TK : Terminal killing.

A : Cumulative number of dead animals.

B : Mortality rate (%).

Appendix 8-4 Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

(1000 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
037																
038																
039																
040																
041																
042																
043																
044																
045																
046																
047																
048																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
037																
038																
039																
040																
041																
042																
043																
044																
045																
046																
047																
048																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration											
	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
037											TK	
038											TK	
039											TK	
040											TK	
041											TK	
042											TK	
043											TK	
044											TK	
045											TK	
046											TK	
047											TK	
048											TK	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

TK : Terminal killing.      A : Cumulative number of dead animals.      B : Mortality rate (%).

Appendix 9-1 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (0 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
501																
502																
503																
504																
505																
506																
507																
508																
509																
510																
511																
512																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
501																
502																
503																
504																
505																
506																
507																
508																
509																
510																
511																
512																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	
501													TK			
502											TK					
503														TK		
504														TK		
505														TK		
506												TK				
507													TK			
508												TK				
509												TK				
510											TK					
511														TK		
512															TK	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TK : Terminal killing on day 5 after parturition.

A : Cumulative number of dead animals.

B : Mortality rate (%).

## Appendix 9-2

Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

(100 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
513																
514																
515																
516																
517																
518																
519																
520																
521																
522																
523																
524																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
513																
514																
515																
516																
517																
518																
519																
520																
521																
522																
523																
524																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	
513												TK				
514														TK		
515														TK		
516														TK		
517												TK				
518												TK				
519												TK				
520															TK	
521													TK			
522													TK			
523											TK					
524											TK					
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

TK : Terminal killing on day 5 after parturition.

A : Cumulative number of dead animals.

B : Mortality rate (%).

Appendix 9-3 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (300 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
525																
526																
527																
528																
529																
530																
531																
532																
533																
534																
535																
536																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
525																
526																
527																
528																
529																
530																
531																
532																
533																
534																
535																
536																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	
525															TK	
526													TK			
527											TK					
528												TK				
529												TK				
530												TK				
531														TK		
532											TK					
533												TK				
534												TK				
535												TK				
536														TK		
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

TK : Terminal killing on day 5 after parturition.

A : Cumulative number of dead animals. B : Mortality rate (%).

Appendix 9-4 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (1000 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
537																
538																
539																
540																
541																
542																
543																
544																
545																
546																
547																
548																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
537																
538																
539																
540																
541																
542																
543																
544																
545																
546																
547																
548																
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration															
	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	
537																TK
538															TK	
539													TK			
540													TK			
541												TK				
542													TK			
543											TK					
544														TK		
545											TK					
546													TK			
547													TK			
548													TK			
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

TK : Terminal killing on day 5 after parturition.

A : Cumulative number of dead animals. B : Mortality rate (%).

Appendix 10 Individual general conditions of male rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Fate	Days of death	General conditions
0	001	TK	43	NAD
	002	TK	43	NAD
	003	TK	43	NAD
	004	TK	43	NAD
	005	TK	43	NAD
	006	TK	43	NAD
	007	TK	43	NAD
	008	TK	43	NAD
	009	TK	43	NAD
	010	TK	43	NAD
	011	TK	43	NAD
	012	TK	43	NAD
100	013	TK	43	NAD
	014	TK	43	NAD
	015	TK	43	NAD
	016	TK	43	NAD
	017	TK	43	NAD
	018	TK	43	NAD
	019	TK	43	NAD
	020	TK	43	NAD
	021	TK	43	NAD
	022	TK	43	NAD
	023	TK	43	NAD
	024	TK	43	NAD
300	025	TK	43	NAD
	026	TK	43	NAD
	027	TK	43	NAD
	028	TK	43	NAD
	029	TK	43	NAD
	030	TK	43	NAD
	031	TK	43	NAD
	032	TK	43	NAD
	033	TK	43	NAD
	034	TK	43	NAD
	035	TK	43	NAD
	036	TK	43	NAD
1000	037	TK	43	NAD
	038	TK	43	NAD
	039	TK	43	NAD
	040	TK	43	NAD
	041	TK	43	NAD
	042	TK	43	NAD
	043	TK	43	NAD
	044	TK	43	NAD
	045	TK	43	NAD
	046	TK	43	NAD
	047	TK	43	NAD
	048	TK	43	NAD

TK : Terminal killing.

NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 11 Individual general conditions of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Fate	Days of death	General conditions
0	501	TK	45	NAD
	502	TK	43	NAD
	503	TK	46	NAD
	504	TK	46	NAD
	505	TK	46	NAD
	506	TK	44	NAD
	507	TK	45	NAD
	508	TK	44	NAD
	509	TK	44	NAD
	510	TK	43	NAD
	511	TK	46	NAD
	512	TK	47	NAD
100	513	KR	44	NAD
	514	KR	46	NAD
	515	KR	46	NAD
	516	KR	46	NAD
	517	KR	44	NAD
	518	TK	44	NAD
	519	TK	44	NAD
	520	TK	47	NAD
	521	TK	45	NAD
	522	TK	45	NAD
	523	TK	43	NAD
	524	TK	43	NAD
300	525	TK	47	NAD
	526	TK	45	NAD
	527	TK	43	NAD
	528	TK	44	NAD
	529	TK	44	NAD
	530	TK	44	NAD
	531	TK	46	NAD
	532	TK	43	NAD
	533	TK	44	NAD
	534	TK	44	NAD
	535	TK	44	NAD
	536	TK	46	NAD
1000	537	TK	47	NAD
	538	TK	46	NAD
	539	TK	45	NAD
	540	TK	45	NAD
	541	TK	44	NAD
	542	TK	45	NAD
	543	TK	43	NAD
	544	TK	46	NAD
	545	TK	43	NAD
	546	TK	45	NAD
	547	TK	45	NAD
	548	TK	45	NAD

TK : Terminal killing on day 5 after parturition.

NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 12-1 Individual body weights of male rats treated orally with  
(2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Administration period							Gain 1~42
		Day 1	7	14	21	28	35	42	
0	001	383	410	446	468	497	508	502	119
	002	375	405	435	452	472	483	498	123
	003	354	385	416	432	464	481	492	138
	004	401	424	468	489	537	562	586	185
	005	367	377	388	408	421	438	459	92
	006	370	414	434	460	496	510	531	161
	007	354	377	406	422	451	467	477	123
	008	394	417	439	465	498	520	538	144
	009	392	422	457	481	518	543	565	173
	010	359	396	431	454	489	510	517	158
	011	405	439	473	482	513	543	557	152
	012	359	384	406	421	436	459	480	121
		Mean	376	404	433	453	483	502	517
100	013	357	384	402	417	438	440	454	97
	014	388	420	450	479	509	528	552	164
	015	366	396	422	446	454	473	489	123
	016	406	432	449	480	502	534	556	150
	017	363	384	409	432	461	480	484	121
	018	387	420	447	471	492	512	537	150
	019	381	405	426	442	462	489	493	112
	020	377	419	444	466	502	522	540	163
	021	384	408	429	445	477	495	515	131
	022	366	388	415	438	461	482	501	135
	023	390	429	457	470	492	513	518	128
	024	357	388	421	435	459	482	496	139
		Mean	377	406	431	452	476	496	511

Appendix 12-2 Individual body weights of male rats treated orally with  
(2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Administration period							Gain 1~42
		Day 1	7	14	21	28	35	42	
300	025	372	396	416	437	462	485	504	132
	026	363	380	401	419	437	455	468	105
	027	379	415	443	464	487	510	522	143
	028	386	407	439	454	472	501	515	129
	029	361	386	402	411	433	452	464	103
	030	383	410	442	454	489	507	522	139
	031	367	393	409	423	447	464	478	111
	032	367	393	411	433	461	477	493	126
	033	401	433	463	480	519	544	569	168
	034	385	404	435	452	485	513	535	150
	035	395	439	477	502	528	556	574	179
	036	364	394	415	433	465	491	505	141
		Mean	377	404	429	447	474	496	512
1000	037	388	402	427	447	469	478	479	91
	038	350	371	395	420	437	445	441	91
	039	384	415	434	459	490	503	524	140
	040	375	401	421	435	457	473	482	107
	041	404	438	463	485	502	520	518	114
	042	373	400	427	457	488	504	518	145
	043	375	397	433	449	487	517	534	159
	044	369	386	414	429	455	481	497	128
	045	367	397	414	434	462	470	470	103
	046	368	395	415	434	447	472	484	116
	047	377	409	440	455	474	497	524	147
	048	401	429	447	477	499	523	540	139
		Mean	378	403	428	448	472	490	501

Appendix 13-1 Individual body weights of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

		(g)											
Dose (mg/kg/day)	Animal number	Premating period				Pregnancy period				Lactation period			
		Day	1	7	14	Gain 1~14	0	7	14	20	Gain 0~20	0	4
0	501	236	244	242	6	256	297	339	425	169	301	344	43
	502	250	259	272	22	274	309	341	432	158	317	334	17
	503	247	244	268	21	277	310	350	433	156	305	337	32
	504	242	237	245	3	259	286	330	412	153	290	321	31
	505	254	251	266	12	284	318	357	445	161	331	353	22
	506	230	244	255	25	260	298	334	387	127	323	338	15
	507	237	252	253	16	264	302	341	412	148	335	345	10
	508	240	234	252	12	260	297	344	437	177	307	356	49
	509	230	246	254	24	250	291	334	422	172	302	339	37
	510	247	265	281	34	279	322	361	438	159	367	332	35
	511	262	256	278	16	290	326	378	477	187	333	353	20
	512	248	253	269	21	282	317	350	438	156	283	341	58
	Mean	244	249	261	18	270	306	347	430	160	316	341	25
100	513	246	265	270	24	271	303	341	440	169	297	338	41
	514	232	241	238	6	262	296	338	418	156	297	336	39
	515	226	236	244	18	254	297	337	421	167	278	318	40
	516	250	256	254	4	281	320	369	462	181	321	363	42
	517	245	265	278	33	278	319	355	447	169	308	363	55
	518	232	237	246	14	244	269	302	371	127	293	322	29
	519	220	229	230	10	245	283	320	402	157	284	315	31
	520	256	252	272	16	288	323	356	428	140	338	361	23
	521	232	252	254	22	256	298	347	429	173	327	347	20
	522	255	253	256	1	276	322	367	472	196	344	369	25
	523	238	246	256	18	265	312	350	421	156	305	331	26
	524	253	272	279	26	279	314	349	422	143	311	354	43
	Mean	240	250	256	16	267	305	344	428	161	309	343	35

Appendix 13-2 Individual body weights of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Premating period				Pregnancy period				Lactation period			
		Day	1	7	14	Gain 1~14	0	7	14	20	Gain 0~20	0	4
300	525	251	257	272	21	297	316	353	440	143	306	368	62
	526	245	261	275	30	284	322	365	459	175	366	384	18
	527	237	254	265	28	265	301	339	422	157	306	340	34
	528	242	255	269	27	272	307	349	454	182	309	346	37
	529	240	263	268	28	280	304	306	383	103	275	306	31
	530	217	233	243	26	253	280	316	385	132	294	325	31
	531	256	254	269	13	285	318	350	453	168	317	362	45
	532	246	261	267	21	271	306	350	437	166	315	348	33
	533	240	258	271	31	269	302	337	416	147	292	338	46
	534	242	256	268	26	270	309	348	429	159	308	349	41
	535	220	245	260	40	258	301	334	434	176	316	340	24
	536	251	266	270	19	282	306	335	417	135	290	339	49
		Mean	241	255	266	26	274	306	340	427	154	308	345
1000	537	271	279	290	19	304	327	366	435	131	333	365	32
	538	233	242	237	4	262	282	310	391	129	274	321	47
	539	229	236	233	4	245	266	287	348	103	264	287	23
	540	250	256	252	2	268	313	364	437	169	321	370	49
	541	248	249	270	22	269	295	345	442	173	315	347	32
	542	235	238	247	12	269	289	319	403	134	282	320	38
	543	249	262	272	23	267	317	361	443	176	324	361	37
	544	237	246	260	23	271	292	335	406	135	280	321	41
	545	248	256	259	11	260	303	345	434	174	322	355	33
	546	241	243	246	5	269	290	325	393	124	287	318	31
	547	246	260	263	17	269	304	341	413	144	309	342	33
	548	248	255	254	6	266	308	343	430	164	343	344	1
		Mean	245	252	257	12	268	299	337	415	146	305	338

## Appendix 14-1

Individual food consumption of male rats treated orally with  
(2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in  
the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Administration period (g/rat/day)						
			1	7	14	21	28	35	41
0	001		32	32	34	34	30	31	29
	002		31	33	32	34	33	31	32
	003		33	31	30	31	27	29	30
	004		37	32	34	37	35	39	35
	005		30	27	28	28	28	31	29
	006		36	32	33	34	35	34	32
	007		29	31	32	32	30	30	30
	008		33	29	32	36	34	34	34
	009		33	32	36	38	39	37	35
	010		33	32	34	34	30	32	30
	011		39	35	33	34	34	36	34
	012		33	29	32	30	34	30	31
		Mean		33	31	33	34	32	33
100	013		29	27	22	30	29	24	28
	014		28	34	30	30	33	30	36
	015		33	32	32	29	30	30	32
	016		34	36	35	34	36	34	36
	017		29	29	28	33	30	32	30
	018		35	34	35	35	32	33	35
	019		33	23	28	31	34	32	30
	020		39	31	30	37	30	36	36
	021		33	30	28	31	33	34	35
	022		31	31	33	33	33	32	31
	023		37	37	39	33	30	31	29
	024		31	34	26	31	32	31	33
		Mean		33	32	31	32	32	32

## Appendix 14-2

Individual food consumption of male rats treated orally with  
(2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in  
the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Administration period (g/rat/day)						
			1	7	14	21	28	35	41
300	025		38	37	34	33	31	30	34
	026		36	32	30	32	28	29	32
	027		32	31	33	34	29	34	30
	028		35	32	31	30	30	33	32
	029		32	27	28	30	27	27	29
	030		32	29	33	37	32	28	32
	031		33	32	31	31	31	30	33
	032		31	28	28	29	31	34	29
	033		36	38	33	38	37	34	37
	034		32	34	31	35	35	33	35
	035		34	36	35	35	34	35	35
	036		33	31	27	30	32	30	32
		Mean		34	32	31	33	31	31
1000	037		27	31	28	31	28	28	27
	038		24	31	30	28	28	24	26
	039		33	31	31	35	32	27	31
	040		32	31	28	30	30	29	27
	041		32	34	36	36	30	29	26
	042		32	33	32	33	33	34	32
	043		29	34	31	34	32	37	36
	044		28	29	31	35	30	32	35
	045		32	31	31	31	30	29	29
	046		33	32	31	33	31	30	29
	047		36	33	36	28	38	38	35
	048		35	37	34	38	34	37	34
		Mean		31	32	32	33	31	31

Appendix 15-1 Individual food consumption of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium in the reproduction/developmental toxicity screening test

		( g/rat/day )									
Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Premating period			Pregnancy period				Lactation period	
			1	7	14	0	7	14	20	0	3
0	501		17	24	23	22	28	28	30	26	63
	502		25	16	25	23	26	28	29	23	52
	503		26	26	17	20	31	29	28	27	50
	504		23	22	17	22	25	30	27	25	47
	505		23	25	15	19	30	31	34	26	53
	506		26	29	23	21	30	27	1	25	79
	507		21	24	23	17	24	23	31	25	51
	508		20	25	22	28	28	29	32	10	60
	509		23	15	23	23	26	27	31	28	54
	510		25	27	24	19	28	31	27	16	27
	511		24	27	20	24	31	30	24	23	50
	512		26	25	22	21	27	26	23	24	61
		Mean		23	24	21	22	28	28	26	23
100	513		25	25	23	20	30	32	23	20	53
	514		16	19	25	20	25	12	24	23	58
	515		20	24	23	23	26	22	24	28	51
	516		17	27	28	25	31	1	28	22	60
	517		24	20	22	23	26	28	26	27	58
	518		19	20	21	14	24	23	25	26	44
	519		22	22	23	19	23	21	28	22	52
	520		29	24	18	24	32	29	33	24	50
	521		21	23	23	18	31	32	32	28	61
	522		15	25	23	16	28	25	27	19	51
	523		24	16	24	23	31	29	26	19	50
	524		29	23	25	22	26	27	27	22	56
		Mean		22	22	23	21	28	23	27	23

Appendix 15-2 Individual food consumption of female rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	( g/rat/day )								
			Premating period			Pregnancy period				Lactation period	
			1	7	14	0	7	14	20	0	3
300	525		23	25	19	21	28	29	31	23	67
	526		22	26	26	15	34	36	29	32	63
	527		28	17	24	23	30	28	28	23	59
	528		24	21	27	22	29	30	27	28	57
	529		25	21	26	17	21	30	20	13	40
	530		24	22	22	18	20	24	27	22	45
	531		25	26	17	27	24	27	24	24	81
	532		24	18	25	25	26	26	29	29	45
	533		23	17	24	17	24	25	28	26	60
	534		24	18	25	24	28	28	29	29	56
	535		25	30	26	18	25	38	30	24	55
	536		18	23	22	18	22	2	27	23	59
	Mean		24	22	24	20	26	27	27	25	57
1000	537		29	24	21	21	25	28	27	24	51
	538		16	24	23	17	18	25	28	23	47
	539		21	17	20	14	13	12	27	44	44
	540		13	21	23	11	25	20	20	26	60
	541		18	24	23	16	27	28	29	22	53
	542		16	23	20	21	17	19	24	24	43
	543		25	21	25	22	29	30	33	30	62
	544		26	23	23	20	19	28	19	26	50
	545		22	19	19	19	26	28	30	24	54
	546		11	23	25	15	22	8	25	20	39
	547		20	24	21	19	25	19	30	27	61
	548		17	22	22	21	23	5	27	10	46
	Mean		20	22	22	18	22	21	27	25	51

Appendix 16-1 Individual pathological findings of male rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy		Histology
0	001	NAD	a	NAD
	002	NAD	a	NAD
	003	NAD	a	NAD
	004	NAD	a	NAD
	005	NAD	a	NAD
	006	NAD	a	NAD
	007	NAD	a	Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +
	008	NAD	a	NAD
	009	NAD	a	NAD
	010	NAD	a	Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +
	011	NAD	a	NAD
	012	Epididymis : Nodule, left side +	a	Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium + Epididymis : Spermatic granuloma +

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

a : Organs of the testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

Appendix 16-2 Individual pathological findings of male rats treated orally with (2-methylproprenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy	Histology
100	013	NAD	Not examined
	014	NAD	Not examined
	015	NAD	Not examined
	016	NAD	Not examined
	017	NAD	Not examined
	018	NAD	Not examined
	019	NAD	Not examined
	020	NAD	Not examined
	021	NAD	Not examined
	022	NAD	Not examined
	023	NAD	Not examined
	024	NAD	Not examined

NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 16-3 Individual pathological findings of male rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy	Histology
300	025	NAD	Not examined
	026	NAD	Not examined
	027	Epididymis : Nodule, right side +	Epididymis <sup>c</sup> : Spermatic granuloma +
	028	NAD	Not examined
	029	NAD	Not examined
	030	NAD	Not examined
	031	NAD	Not examined
	032	NAD	Not examined
	033	NAD	Not examined
	034	NAD	Not examined
	035	NAD	Not examined
	036	NAD	Not examined

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

c : Examined the animal with a macroscopic abnormality.

Appendix 16-4 Individual pathological findings of male rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy		Histology
1000	037	NAD	a	NAD
	038	NAD	a	NAD
	039	NAD	a	NAD
	040	NAD	a	NAD
	041	NAD	a	NAD
	042	NAD	a	NAD
	043	NAD	a	NAD
	044	NAD	a	NAD
	045	NAD	a	NAD
	046	NAD	a	NAD
	047	NAD	a	NAD
	048	NAD	a	NAD

NAD : No abnormalities were detected.

a : Organs of the testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

Appendix 16-5 The number of cells in seminiferous epithelia assessed by the individual examination  
(2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal No.	Stage II-III			Stage V			Stage VII			Stage X II	
		G	P	T	G	P	T	G	R/P	T	G	Z/P
0	001	0.49	1.62	5.96	0.59	2.10	6.38	0.07	3.23	6.92	0.06	4.50
	002	0.42	1.83	5.53	0.53	1.70	5.58	0.06	2.74	5.73	0.05	4.29
	003	0.46	1.95	6.30	0.64	1.83	5.83	0.05	3.47	6.38	0.05	4.49
	004	0.49	1.87	5.08	0.53	1.94	6.34	0.05	3.08	5.64	0.06	4.90
	005	0.40	2.23	7.18	0.63	2.03	6.55	0.06	2.88	6.40	0.07	4.41
	006	0.43	1.84	6.12	0.61	1.77	5.71	0.06	3.12	7.18	0.06	4.51
	007	0.49	1.85	5.95	0.66	1.87	6.48	0.05	2.94	5.67	0.05	4.37
	008	0.53	1.67	6.44	0.55	1.82	6.27	0.05	3.12	6.24	0.06	3.90
	009	0.50	1.73	5.61	0.50	1.94	5.64	0.05	3.09	6.47	0.06	4.29
	010	0.46	1.62	5.55	0.63	1.98	5.94	0.06	2.52	5.06	0.06	4.17
	011	0.44	1.93	6.46	0.61	1.90	6.11	0.05	3.31	6.52	0.05	4.14
	012	0.49	1.97	6.58	0.66	1.81	6.04	0.06	3.11	6.20	0.08	4.52
	Mean	0.47	1.84	6.06	0.60	1.89	6.07	0.06	3.05	6.20	0.06	4.37
1000	037	0.47	1.74	5.79	0.55	1.51	5.68	0.05	2.76	6.54	0.06	5.04
	038	0.41	1.74	6.18	0.58	1.83	6.39	0.06	3.00	6.34	0.07	4.36
	039	0.47	1.84	6.46	0.53	1.96	6.51	0.05	3.04	6.14	0.07	4.50
	040	0.38	1.96	5.59	0.58	1.99	5.86	0.07	2.85	6.00	0.05	4.66
	041	0.41	1.71	5.29	0.61	1.96	6.07	0.06	2.80	6.26	0.06	4.24
	042	0.43	1.67	6.10	0.60	1.78	6.29	0.06	3.54	6.64	0.06	4.09
	043	0.44	1.54	5.90	0.58	1.83	6.31	0.06	2.95	5.95	0.05	4.10
	044	0.52	1.68	5.81	0.56	1.99	6.59	0.08	2.90	6.06	0.06	4.34
	045	0.46	1.71	6.30	0.63	1.75	6.17	0.05	3.04	6.52	0.07	4.09
	046	0.47	1.91	6.28	0.60	1.89	6.42	0.07	3.17	6.13	0.06	4.17
	047	0.47	1.82	6.43	0.59	1.81	6.00	0.06	3.28	6.25	0.06	3.58
	048	0.45	1.77	6.62	0.63	1.79	6.58	0.05	2.88	6.25	0.07	4.13
	Mean	0.45	1.76	6.06	0.59	1.84	6.24	0.06	3.02	6.26	0.06	4.28

G : spermatogonia.

P : pachytene spermatocyte.

R : preleptotene spermatocyte.

Z : zygotene spermatocyte.

T : round spermatid.

Each value represents the mean for data from 3 seminiferous epithelia.

Appendix 17-1 Individual pathological findings of female rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy		Histology
0	501	NAD	b	NAD
	502	NAD	b	NAD
	503	NAD	b	NAD
	504	NAD	b	NAD
	505	NAD	b	NAD
	506	NAD	b	NAD
	507	NAD	b	NAD
	508	NAD	b	NAD
	509	NAD	b	NAD
	510	NAD	b	NAD
	511	NAD	b	NAD
	512	NAD	b	NAD

NAD : No abnormalities were detected.

b : Organs of the ovary and uterus were examined.

Appendix 17-2 Individual pathological findings of female rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy	Histology
100	513	NAD	Not examined
	514	NAD	Not examined
	515	NAD	Not examined
	516	NAD	Not examined
	517	NAD	Not examined
	518	NAD	Not examined
	519	NAD	Not examined
	520	NAD	Not examined
	521	NAD	Not examined
	522	NAD	Not examined
	523	NAD	Not examined
	524	NAD	Not examined

NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 17-3 Individual pathological findings of female rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy	Histology
300	525	NAD	Not examined
	526	NAD	Not examined
	527	NAD	Not examined
	528	NAD	Not examined
	529	NAD	Not examined
	530	NAD	Not examined
	531	NAD	Not examined
	532	NAD	Not examined
	533	NAD	Not examined
	534	NAD	Not examined
	535	NAD	Not examined
	536	NAD	Not examined

NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 17-4 Individual pathological findings of female rats treated orally with (2-methylproprenoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy		Histology
1000	537	NAD	b	NAD
	538	NAD	b	NAD
	539	NAD	b	NAD
	540	NAD	b	NAD
	541	NAD	b	NAD
	542	NAD	b	NAD
	543	NAD	b	NAD
	544	NAD	b	NAD
	545	NAD	b	NAD
	546	NAD	b	NAD
	547	NAD	b	NAD
	548	NAD	b	NAD

NAD : No abnormalities were detected.

b : Organs of the ovary and uterus were examined.

## Appendix 18-1

Individual absolute organ weights of male rats treated orally with  
(2-methylpropionoxyethyl)trimethylammonium chloride  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	B.W. (g)	Prostate (g)	Seminal vesicle (g)	Testis (g)	Epididymis (g)
0	001	471	0.93	2.68	3.52	1.62
	002	467	1.07	2.29	3.24	1.32
	003	460	0.58	2.22	3.35	1.42
	004	540	0.55	2.72	3.06	1.25
	005	421	0.93	2.50	3.15	1.44
	006	500	0.95	1.96	3.46	1.54
	007	441	0.42	2.16	3.33	1.32
	008	508	0.95	2.77	3.33	1.63
	009	528	0.31	2.44	3.79	1.50
	010	482	0.54	1.74	3.22	1.28
	011	519	0.52	2.04	3.84	1.57
	012	447	0.67	2.19	3.22	1.37
		Mean	482	0.70	2.31	3.38
100	013	427	0.73	2.96	3.37	1.63
	014	517	0.83	2.56	3.34	1.43
	015	459	0.72	2.04	3.70	1.74
	016	519	0.56	2.38	3.74	1.65
	017	455	0.65	2.18	3.63	1.39
	018	509	1.02	2.21	3.33	1.47
	019	467	1.13	2.17	3.46	1.63
	020	507	0.59	1.67	3.28	1.31
	021	481	0.86	2.02	3.26	1.36
	022	478	0.63	2.25	2.95	1.20
	023	489	0.76	2.85	3.49	1.39
	024	472	0.39	2.15	3.19	1.34
		Mean	482	0.74	2.29	3.40

## Appendix 18-2

Individual absolute organ weights of male rats treated orally with  
(2-methylpropionoyloxyethyl)trimethylammonium chloride  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	B.W. (g)	Prostate (g)	Seminal vesicle (g)	Testis (g)	Epididymis (g)
300	025	469	1.11	2.72	3.47	1.39
	026	440	0.77	2.34	3.60	1.45
	027	484	0.79	2.00	3.58	1.49
	028	483	0.51	2.26	3.43	1.45
	029	431	0.49	1.83	2.96	1.24
	030	490	0.69	1.94	3.02	1.33
	031	442	0.86	2.13	2.89	1.46
	032	461	0.82	2.10	3.47	1.33
	033	525	0.95	2.27	3.79	1.34
	034	493	1.14	2.36	3.56	1.61
	035	529	0.85	2.03	3.14	1.34
	036	470	0.63	1.82	3.15	1.32
		Mean	476	0.80	2.15	3.34
1000	037	455	0.69	2.29	3.81	1.53
	038	419	0.68	2.21	3.09	1.37
	039	486	0.95	2.44	3.35	1.33
	040	458	0.60	2.08	2.88	1.27
	041	483	0.46	2.21	3.52	1.44
	042	485	0.85	2.21	3.41	1.37
	043	494	0.79	1.97	3.65	1.53
	044	457	0.69	2.39	3.15	1.34
	045	441	0.65	2.25	3.49	1.26
	046	455	0.69	2.49	3.33	1.28
	047	481	0.73	2.28	3.43	1.30
	048	498	1.07	2.60	3.27	1.58
		Mean	468	0.74	2.29	3.37

Appendix 19-1 Individual relative organ weights of male rats treated orally with (2-methylpropionoyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	B.W. (g)	Prostate (%)	Seminal vesicle (%)	Testis (%)	Epididymis (%)
0	001	471	0.20	0.57	0.75	0.34
	002	467	0.23	0.49	0.69	0.28
	003	460	0.13	0.48	0.73	0.31
	004	540	0.10	0.50	0.57	0.23
	005	421	0.22	0.59	0.75	0.34
	006	500	0.19	0.39	0.69	0.31
	007	441	0.10	0.49	0.76	0.30
	008	508	0.19	0.55	0.66	0.32
	009	528	0.06	0.46	0.72	0.28
	010	482	0.11	0.36	0.67	0.27
	011	519	0.10	0.39	0.74	0.30
	012	447	0.15	0.49	0.72	0.31
		Mean	482	0.15	0.48	0.70
100	013	427	0.17	0.69	0.79	0.38
	014	517	0.16	0.50	0.65	0.28
	015	459	0.16	0.44	0.81	0.38
	016	519	0.11	0.46	0.72	0.32
	017	455	0.14	0.48	0.80	0.31
	018	509	0.20	0.43	0.65	0.29
	019	467	0.24	0.46	0.74	0.35
	020	507	0.12	0.33	0.65	0.26
	021	481	0.18	0.42	0.68	0.28
	022	478	0.13	0.47	0.62	0.25
	023	489	0.16	0.58	0.71	0.28
	024	472	0.08	0.46	0.68	0.28
		Mean	482	0.15	0.48	0.71

## Appendix 19-2

Individual relative organ weights of male rats treated orally with  
(2-methylpropionoxyethyl)trimethylammonium chloride  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	B.W. (g)	Prostate (%)	Seminal vesicle (%)	Testis (%)	Epididymis (%)
300	025	469	0.24	0.58	0.74	0.30
	026	440	0.18	0.53	0.82	0.33
	027	484	0.16	0.41	0.74	0.31
	028	483	0.11	0.47	0.71	0.30
	029	431	0.11	0.42	0.69	0.29
	030	490	0.14	0.40	0.62	0.27
	031	442	0.19	0.48	0.65	0.33
	032	461	0.18	0.46	0.75	0.29
	033	525	0.18	0.43	0.72	0.26
	034	493	0.23	0.48	0.72	0.33
	035	529	0.16	0.38	0.59	0.25
	036	470	0.13	0.39	0.67	0.28
		Mean	476	0.17	0.45	0.70
1000	037	455	0.15	0.50	0.84	0.34
	038	419	0.16	0.53	0.74	0.33
	039	486	0.20	0.50	0.69	0.27
	040	458	0.13	0.45	0.63	0.28
	041	483	0.10	0.46	0.73	0.30
	042	485	0.18	0.46	0.70	0.28
	043	494	0.16	0.40	0.74	0.31
	044	457	0.15	0.52	0.69	0.29
	045	441	0.15	0.51	0.79	0.29
	046	455	0.15	0.55	0.73	0.28
	047	481	0.15	0.47	0.71	0.27
	048	498	0.21	0.52	0.66	0.32
		Mean	468	0.16	0.49	0.72

Appendix 20 Individual estrous cycle of rats before mating period treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day of the inspection period															Mean estrous cycle# (day)	Group mean estrous cycle (day)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
0	501	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	4.2  (0/12) <sup>a</sup>
	502	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	503	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	504	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	505	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	506	III	IV	V	I	III	III	IV	V	V	I	III	IV	I	V	I	5.0	
	507	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	508	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	IV	V	I	4.0	
	509	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	510	III	IV	V	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	V	I	5.0	
	511	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	512	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
100	513	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	4.1  (0/12)
	514	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	515	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	516	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	517	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	518	III	III	IV	V	I	III	III	IV	V	V	I	III	IV	V	I	5.5	
	519	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	520	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	521	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	522	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	523	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	524	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
300	525	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	4.0  (0/12)
	526	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	527	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	528	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	529	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	530	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	531	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	532	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	533	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	534	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	535	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	536	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
1000	537	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	4.2  (0/12)
	538	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	539	V	I	III	III	IV	V	V	I	III	IV	V	I	III	III	IV	5.0	
	540	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	541	III	III	IV	V	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	I	5.5	
	542	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	543	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	544	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	III	IV	3.7	
	545	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	546	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	547	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	548	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	

I : Proestrus. III: Metaestrus I. IV: Metaestrus II. V: Diestrus. #: Mean days from III to next III.  
a : (No. of females with disorder of estrous cycle/No. of females).

## Appendix 21-1

Individual estrous cycle of rats in mating period treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

(0 mg/kg/day)

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		1			2			3			4		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
501	001	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
502	002	+	III	+									
503	003	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+
504	004	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+
505	005	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+
506	006	+	III	+									
507	007	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
508	008	+	III	+									
509	009	+	III	+									
510	010	+	III	+									
511	011	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+
512	012	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		5			6			7			8		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
501	001												
502	002												
503	003												
504	004												
505	005												
506	006												
507	007												
508	008												
509	009												
510	010												
511	011												
512	012												

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		9			10			11			12		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
501	001												
502	002												
503	003												
504	004												
505	005												
506	006												
507	007												
508	008												
509	009												
510	010												
511	011												
512	012												

Female number	Paired male number	Day of the mating period						Pairing Day until copulation (Day)	Group mean pairing Day until copulation (Day)
		13			14				
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm		
501	001							3	
502	002							1	
503	003							4	
504	004							4	
505	005							4	
506	006							1	
507	007							3	2.6
508	008							1	
509	009							1	
510	010							1	
511	011							4	
512	012							4	

I: Proestrus. III: Metaestrus I. IV: Metaestrus II. V: Diestrus. '+': Confirmed. '-': Not confirmed.

## Appendix 21-2

Individual estrous cycle of rats in mating period treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

( 100 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		1			2			3			4		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
513	013	-	I	-	+	III	+						
514	014	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
515	015	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
516	016	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
517	017	+	III	+									
518	018	-	III	-	+	III	+						
519	019	-	I	-	+	III	+						
520	020	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+
521	021	-	I	-	+	III	+						
522	022	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
523	023	+	III	+									
524	024	+	III	+									

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		5			6			7			8		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
513	013												
514	014												
515	015												
516	016												
517	017												
518	018												
519	019												
520	020												
521	021												
522	022												
523	023												
524	024												

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		9			10			11			12		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
513	013												
514	014												
515	015												
516	016												
517	017												
518	018												
519	019												
520	020												
521	021												
522	022												
523	023												
524	024												

Female number	Paired male number	Day of the mating period						Pairing Day until copulation (Day)	Group mean pairing Day until copulation (Day)
		13			14				
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm		
513	013							2	
514	014							3	
515	015							3	
516	016							3	
517	017							1	
518	018							2	
519	019							2	2.3
520	020							4	
521	021							2	
522	022							3	
523	023							1	
524	024							1	

I : Proestrus. III: Metaestrus I. IV: Metaestrus II. V: Diestrus. '+': Confirmed. '-': Not confirmed.

## Appendix 21-3

Individual estrous cycle of rats in mating period treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

( 300 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		1			2			3			4		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
525	025	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+
526	026	-	I	-	+	III	+						
527	027	+	III	+									
528	028	+	III	+									
529	029	-	I	-	+	III	+						
530	030	-	I	-	+	III	+						
531	031	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+
532	032	+	III	+									
533	033	-	III	+									
534	034	-	III	+									
535	035	-	I	-	+	III	+						
536	036	-	V	-	-	I	-	+	III	+			

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		5			6			7			8		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
525	025												
526	026												
527	027												
528	028												
529	029												
530	030												
531	031												
532	032												
533	033												
534	034												
535	035												
536	036												

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		9			10			11			12		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
525	025												
526	026												
527	027												
528	028												
529	029												
530	030												
531	031												
532	032												
533	033												
534	034												
535	035												
536	036												

Female number	Paired male number	Day of the mating period						Pairing Day until copulation (Day)	Group mean pairing Day until copulation (Day)
		13			14				
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm		
525	025							4	
526	026							2	
527	027							1	
528	028							1	
529	029							2	
530	030							2	
531	031							4	2.0
532	032							1	
533	033							1	
534	034							1	
535	035							2	
536	036							3	

I : Proestrus. III: Metaestrus I. IV: Metaestrus II. V: Diestrus. '+': Confirmed. '-': Not confirmed.

## Appendix 21-4

## Individual estrous cycle of rats in mating period treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

( 1000 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		1			2			3			4		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
537	037	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+
538	038	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
539	039	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
540	040	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
541	041	-	I	-	+	III	+						
542	042	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
543	043	+	III	+									
544	044	-	V	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+
545	045	+	III	+									
546	046	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
547	047	-	V	-	-	I	-	+	III	+			
548	048	-	V	-	-	I	-	+	III	+			

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		5			6			7			8		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
537	037												
538	038												
539	039												
540	040												
541	041												
542	042												
543	043												
544	044												
545	045												
546	046												
547	047												
548	048												

Female number	Paired male number	Day of the mating period											
		9			10			11			12		
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
537	037												
538	038												
539	039												
540	040												
541	041												
542	042												
543	043												
544	044												
545	045												
546	046												
547	047												
548	048												

Female number	Paired male number	Day of the mating period						Pairing Day until copulation (Day)	Group mean pairing Day until copulation (Day)
		13			14				
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm		
537	037							4	
538	038							3	
539	039							3	
540	040							3	
541	041							2	
542	042							3	
543	043							1	2.8
544	044							4	
545	045							1	
546	046							3	
547	047							3	
548	048							3	

I : Proestrus. III: Metaestrus I. IV: Metaestrus II. V: Diestrus. '+': Confirmed. '-': Not confirmed.

Appendix 22-1 Individual reproduction results of rats treated orally with (2-methylpropenoxyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 0 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery
501	001	'10.9.18	3	+	+	'10.10.10
502	002	'10.9.16	1	+	+	'10.10.8
503	003	'10.9.19	4	+	+	'10.10.11
504	004	'10.9.19	4	+	+	'10.10.11
505	005	'10.9.19	4	+	+	'10.10.11
506	006	'10.9.16	1	+	+	'10.10.9
507	007	'10.9.18	3	+	+	'10.10.10
508	008	'10.9.16	1	+	+	'10.10.9
509	009	'10.9.16	1	+	+	'10.10.9
510	010	'10.9.16	1	+	+	'10.10.8
511	011	'10.9.19	4	+	+	'10.10.11
512	012	'10.9.19	4	+	+	'10.10.12
		Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)	
		12/12 (100)	12 2.6 1.4	12/12 (100)	12/12 (100)	
Female number	Paired male number	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
501	001	22	TK	17	16	94.1
502	002	22	TK	18	16	88.9
503	003	22	TK	15	15	100.0
504	004	22	TK	15	15	100.0
505	005	22	TK	16	16	100.0
506	006	23	TK	14	10	71.4
507	007	22	TK	16	15	93.8
508	008	23	TK	16	16	100.0
509	009	23	TK	17	16	94.1
510	010	22	TK	14	14	100.0
511	011	22	TK	19	19	100.0
512	012	23	TK	18	18	100.0
		No. Mean S.D.		No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.
		12 22.3 0.5		12 16.3 1.6	12 15.5 2.2	12 95.2 8.4

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100.

Gestation index = (No. of females with live pups /No. of pregnant females)×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition. a : Confirmed. b : Not confirmed.

Appendix 22-2 Individual reproduction results of rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 100 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery
513	013	'10.9.17	2	+	+	'10.10.9
514	014	'10.9.18	3	+	+	'10.10.11
515	015	'10.9.18	3	+	+	'10.10.11
516	016	'10.9.18	3	+	+	'10.10.11
517	017	'10.9.16	1	+	+	'10.10.9
518	018	'10.9.17	2	+	+	'10.10.9
519	019	'10.9.17	2	+	+	'10.10.9
520	020	'10.9.19	4	+	+	'10.10.12
521	021	'10.9.17	2	+	+	'10.10.10
522	022	'10.9.18	3	+	+	'10.10.10
523	023	'10.9.16	1	+	+	'10.10.8
524	024	'10.9.16	1	+	+	'10.10.8

Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)
12/12 (100)	12 2.3 1.0	12/12 (100)	12/12 (100)

Female number	Paired male number	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
513	013	22	TK	17	17	100.0
514	014	23	TK	18	17	94.4
515	015	23	TK	16	16	100.0
516	016	23	TK	17	17	100.0
517	017	23	TK	16	16	100.0
518	018	22	TK	16	13	81.3
519	019	22	TK	16	15	93.8
520	020	23	TK	17	16	94.1
521	021	23	TK	17	17	100.0
522	022	22	TK	16	15	93.8
523	023	22	TK	14	14	100.0
524	024	22	TK	15	15	100.0

No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.
12 22.5 0.5	12 16.3 1.1	12 15.7 1.3	12 96.5 5.6

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100.

Gestation index = (No. of females with live pups /No. of pregnant females)×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition. a : Confirmed. b : Not confirmed.

Appendix 22-3 Individual reproduction results of rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 300 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery
525	025	'10.9.19	4	+	+	'10.10.12
526	026	'10.9.17	2	+	+	'10.10.10
527	027	'10.9.16	1	+	+	'10.10.8
528	028	'10.9.16	1	+	+	'10.10.9
529	029	'10.9.17	2	+	+	'10.10.9
530	030	'10.9.17	2	+	+	'10.10.9
531	031	'10.9.19	4	+	+	'10.10.11
532	032	'10.9.16	1	+	+	'10.10.8
533	033	'10.9.16	1	+	+	'10.10.9
534	034	'10.9.16	1	+	+	'10.10.9
535	035	'10.9.17	2	+	+	'10.10.9
536	036	'10.9.18	3	+	+	'10.10.11
		Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)	
		12/12 (100)	12 2.0 1.1	12/12 (100)	12/12 (100)	
Female number	Paired male number	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
525	025	23	TK	16	15	93.8
526	026	23	TK	16	15	93.8
527	027	22	TK	16	16	100.0
528	028	23	TK	16	16	100.0
529	029	22	TK	17	17	100.0
530	030	22	TK	15	14	93.3
531	031	22	TK	17	17	100.0
532	032	22	TK	15	15	100.0
533	033	23	TK	15	15	100.0
534	034	23	TK	15	15	100.0
535	035	22	TK	17	16	94.1
536	036	23	TK	15	15	100.0
		No. Mean S.D.		No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.
		12 22.5 0.5		12 15.8 0.8	12 15.5 0.9	12 97.9 3.1

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100.

Gestation index = (No. of females with live pups /No. of pregnant females)×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition. a : Confirmed. b : Not confirmed.

Appendix 22-4 Individual reproduction results of rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 1000 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery
537	037	'10.9.19	4	+	+	'10.10.12
538	038	'10.9.18	3	+	+	'10.10.11
539	039	'10.9.18	3	+	+	'10.10.10
540	040	'10.9.18	3	+	+	'10.10.10
541	041	'10.9.17	2	+	+	'10.10.9
542	042	'10.9.18	3	+	+	'10.10.10
543	043	'10.9.16	1	+	+	'10.10.8
544	044	'10.9.19	4	+	+	'10.10.11
545	045	'10.9.16	1	+	+	'10.10.8
546	046	'10.9.18	3	+	+	'10.10.10
547	047	'10.9.18	3	+	+	'10.10.10
548	048	'10.9.18	3	+	+	'10.10.10

Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)
12/12 (100)	12 2.8 1.0	12/12 (100)	12/12 (100)

Female number	Paired male number	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
537	037	23	TK	13	13	100.0
538	038	23	TK	17	13	76.5
539	039	22	TK	14	14	100.0
540	040	22	TK	17	17	100.0
541	041	22	TK	17	16	94.1
542	042	22	TK	15	15	100.0
543	043	22	TK	17	15	88.2
544	044	22	TK	17	17	100.0
545	045	22	TK	18	18	100.0
546	046	22	TK	17	17	100.0
547	047	22	TK	17	16	94.1
548	048	22	TK	16	16	100.0

No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.
12 22.2 0.4	12 16.3 1.5	12 15.6 1.6	12 96.1 7.2

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100.

Gestation index = (No. of females with live pups /No. of pregnant females)×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition. a : Confirmed. b : Not confirmed.

Appendix 23-1 Individual litter results of rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 0 mg/kg/day ]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation						
				Live pups			Dead pups			
				T	M	F	T	M	F	SI
501	16	16	100.0	16	9	7	0	0	0	0
502	16	16	100.0	16	6	10	0	0	0	0
503	15	13	86.7	13	6	7	0	0	0	0
504	15	15	100.0	15	8	7	0	0	0	0
505	16	16	100.0	16	8	8	0	0	0	0
506	10	9	90.0	9	3	6	0	0	0	0
507	15	12	80.0	12	7	5	0	0	0	0
508	16	14	87.5	14	9	5	0	0	0	0
509	16	16	100.0	16	6	10	0	0	0	0
510	14	13	92.9	12	7	5	1	1	0	0
511	19	17	89.5	17	9	8	0	0	0	0
512	18	18	100.0	18	11	7	0	0	0	0
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	15.5	14.6	93.9	14.5	7.4	7.1	0.1	0.1	0.0	0.0
S.D.	2.2	2.5	7.0	2.6	2.1	1.7	0.3	0.3	0.0	0.0

Parental female number	Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
		T	M	F		On day 0		On day 4	
						M	F	M	F
501	100.0	16	9	7	100.0	6.4	6.1	10.2	9.5
502	100.0	16	6	10	100.0	6.9	6.3	11.6	10.3
503	100.0	13	6	7	100.0	7.3	6.8	11.6	11.2
504	100.0	15	8	7	100.0	6.4	5.9	9.0	8.7
505	100.0	16	8	8	100.0	6.6	6.0	10.7	9.8
506	100.0	9	3	6	100.0	8.5	8.2	14.7	13.9
507	100.0	12	7	5	100.0	7.2	6.8	12.1	11.7
508	100.0	14	9	5	100.0	8.0	7.3	12.6	11.5
509	100.0	16	6	10	100.0	6.7	6.8	10.2	10.3
510	92.3	12	7	5	100.0	7.0	6.6	13.3	12.6
511	100.0	17	9	8	100.0	6.5	6.3	10.1	10.1
512	100.0	17	10	7	94.4	6.4	5.9	9.8	8.9
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	99.4	14.4	7.3	7.1	99.5	7.0	6.6	11.3	10.7
S.D.	2.2	2.5	1.9	1.7	1.6	0.7	0.7	1.6	1.5

Sex ratio : 1.06 (Total number of male pups on day 0 of lactation / Total number of female pups on day 0 of lactation = 90 / 85 ).

T : Total. M : Male. F : Female. SI : Sex was indistinction.

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.

Sex ratio = Total number of male pups/Total number of female pups.

Appendix 23-2 Individual litter results of rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 100 mg/kg/day ]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation						
				Live pups			Dead pups			
				T	M	F	T	M	F	SI
513	17	16	94.1	16	14	2	0	0	0	0
514	17	16	94.1	16	7	9	0	0	0	0
515	16	16	100.0	16	9	7	0	0	0	0
516	17	16	94.1	16	7	9	0	0	0	0
517	16	16	100.0	16	6	10	0	0	0	0
518	13	13	100.0	13	8	5	0	0	0	0
519	15	15	100.0	15	3	12	0	0	0	0
520	16	12	75.0	12	5	7	0	0	0	0
521	17	14	82.4	14	3	11	0	0	0	0
522	15	14	93.3	14	7	7	0	0	0	0
523	14	14	100.0	14	6	8	0	0	0	0
524	15	15	100.0	15	8	7	0	0	0	0
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	15.7	14.8	94.4	14.8	6.9	7.8	0.0	0.0	0.0	0.0
S.D.	1.3	1.4	8.0	1.4	2.9	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0

Parental female number	Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
		T	M	F		On day 0		On day 4	
						M	F	M	F
513	100.0	16	14	2	100.0	6.6	6.3	10.3	10.3
514	100.0	16	7	9	100.0	7.0	6.6	10.1	10.2
515	100.0	16	9	7	100.0	6.2	5.8	10.2	9.4
516	100.0	16	7	9	100.0	7.4	6.8	12.5	11.7
517	100.0	16	6	10	100.0	7.1	6.9	10.1	10.0
518	100.0	13	8	5	100.0	6.0	5.9	9.6	10.1
519	100.0	15	3	12	100.0	6.6	6.3	10.7	10.1
520	100.0	12	5	7	100.0	6.7	7.1	11.4	11.7
521	100.0	14	3	11	100.0	7.9	7.4	13.1	11.8
522	100.0	14	7	7	100.0	6.2	6.2	10.5	10.2
523	100.0	14	6	8	100.0	6.7	6.4	10.7	10.8
524	100.0	14	7	7	93.3	5.8	5.7	9.4	8.9
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	100.0	14.7	6.8	7.8	99.4	6.7	6.5	10.7	10.4
S.D.	0.0	1.4	2.9	2.7	1.9	0.6	0.5	1.1	0.9

Sex ratio : 0.88 (Total number of male pups on day 0 of lactation / Total number of female pups on day 0 of lactation = 83 / 94 ).

T : Total. M : Male. F : Female. SI : Sex was indistinction.

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.

Sex ratio = Total number of male pups/Total number of female pups.

Appendix 23-3 Individual litter results of rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 300 mg/kg/day ]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation						
				Live pups			Dead pups			
				T	M	F	T	M	F	SI
525	15	15	100.0	15	9	6	0	0	0	0
526	15	12	80.0	12	5	7	0	0	0	0
527	16	16	100.0	16	4	12	0	0	0	0
528	16	16	100.0	16	7	9	0	0	0	0
529	17	17	100.0	17	7	10	0	0	0	0
530	14	13	92.9	13	6	7	0	0	0	0
531	17	17	100.0	17	9	8	0	0	0	0
532	15	15	100.0	15	5	10	0	0	0	0
533	15	14	93.3	14	8	6	0	0	0	0
534	15	14	93.3	14	10	4	0	0	0	0
535	16	16	100.0	16	8	8	0	0	0	0
536	15	14	93.3	14	3	11	0	0	0	0
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	15.5	14.9	96.1	14.9	6.8	8.2	0.0	0.0	0.0	0.0
S.D.	0.9	1.6	6.0	1.6	2.2	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0

Parental female number	Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
		T	M	F		On day 0		On day 4	
						M	F	M	F
525	100.0	15	9	6	100.0	7.4	7.2	11.5	11.4
526	100.0	12	5	7	100.0	8.1	7.9	13.8	13.7
527	100.0	16	4	12	100.0	6.0	5.7	9.2	9.4
528	100.0	16	7	9	100.0	7.3	6.9	11.4	11.1
529	100.0	16	7	9	94.1	6.0	5.7	9.3	8.7
530	100.0	13	6	7	100.0	6.5	6.1	10.0	9.3
531	100.0	17	9	8	100.0	6.5	6.0	10.3	9.4
532	100.0	15	5	10	100.0	6.7	6.5	11.2	10.5
533	100.0	12	7	5	85.7	7.6	6.6	15.2	12.3
534	100.0	14	10	4	100.0	8.0	7.6	12.9	12.6
535	100.0	15	8	7	93.8	6.7	6.3	11.0	10.7
536	100.0	14	3	11	100.0	8.0	7.2	12.3	11.6
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	100.0	14.6	6.7	7.9	97.8	7.1	6.6	11.5	10.9
S.D.	0.0	1.6	2.1	2.4	4.5	0.8	0.7	1.8	1.5

Sex ratio : 0.83 (Total number of male pups on day 0 of lactation / Total number of female pups on day 0 of lactation = 81 / 98 ).

T : Total. M : Male. F : Female. SI : Sex was indistinction.

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.

Sex ratio = Total number of male pups/Total number of female pups.

Appendix 23-4 Individual litter results of rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl) trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 1000 mg/kg/day ]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation						
				Live pups			Dead pups			
				T	M	F	T	M	F	SI
537	13	13	100.0	13	5	8	0	0	0	0
538	13	12	92.3	12	6	6	0	0	0	0
539	14	12	85.7	12	8	4	0	0	0	0
540	17	17	100.0	17	9	8	0	0	0	0
541	16	16	100.0	16	7	9	0	0	0	0
542	15	15	100.0	15	5	10	0	0	0	0
543	15	15	100.0	15	10	5	0	0	0	0
544	17	16	94.1	16	11	5	0	0	0	0
545	18	17	94.4	17	8	9	0	0	0	0
546	17	14	82.4	13	6	7	1	1	0	0
547	16	16	100.0	16	7	9	0	0	0	0
548	16	15	93.8	14	7	7	1	0	1	0
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	15.6	14.8	95.2	14.7	7.4	7.3	0.2	0.1	0.1	0.0
S.D.	1.6	1.7	6.1	1.8	1.9	1.9	0.4	0.3	0.3	0.0

Parental female number	Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
		T	M	F		On day 0		On day 4	
						M	F	M	F
537	100.0	13	5	8	100.0	8.2	7.5	12.7	11.9
538	100.0	12	6	6	100.0	7.8	7.4	12.4	11.9
539	100.0	12	8	4	100.0	7.2	6.6	11.2	10.6
540	100.0	16	8	8	94.1	6.5	6.4	10.3	9.5
541	100.0	15	6	9	93.8	6.6	6.0	10.2	9.4
542	100.0	15	5	10	100.0	6.5	6.1	9.6	9.6
543	100.0	15	10	5	100.0	6.2	6.0	10.4	9.9
544	100.0	16	11	5	100.0	6.2	6.0	8.9	8.3
545	100.0	17	8	9	100.0	6.4	5.8	9.1	8.9
546	92.9	12	6	6	92.3	6.3	5.8	10.4	9.9
547	100.0	16	7	9	100.0	6.4	6.2	10.3	9.7
548	93.3	14	7	7	100.0	7.1	6.7	10.5	9.9
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	98.9	14.4	7.3	7.2	98.4	6.8	6.4	10.5	10.0
S.D.	2.7	1.8	1.9	1.9	3.0	0.7	0.6	1.1	1.1

Sex ratio : 1.02 (Total number of male pups on day 0 of lactation / Total number of female pups on day 0 of lactation = 90 / 88 ).

T : Total. M : Male. F : Female. SI : Sex was indistinction.

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.

Sex ratio = Total number of male pups/Total number of female pups.

Appendix 24-1 Individual external findings of pups from pregnant rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 0 mg/kg/day ]

Parental female number	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	16	16	13	15	16	9	12	14	16	13	17	18	175	12	—	—
No. of pups examined																
Total	16	16	13	15	16	9	12	14	16	13	17	18	175	12	—	—
Live	16	16	13	15	16	9	12	14	16	12	17	17	173	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

[ 100 mg/kg/day ]

Parental female number	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	16	16	16	16	16	13	15	12	14	14	14	15	177	12	—	—
No. of pups examined																
Total	16	16	16	16	16	13	15	12	14	14	14	15	177	12	—	—
Live	16	16	16	16	16	13	15	12	14	14	14	14	176	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

Appendix 24-2 Individual external findings of pups from pregnant rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 300 mg/kg/day ]

Parental female number	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	15	12	16	16	17	13	17	15	14	14	16	14	179	12	—	—
No. of pups examined																
Total	15	12	16	16	16 <sup>a</sup>	13	17	15	12 <sup>b</sup>	14	15 <sup>a</sup>	14	175	12	—	—
Live	15	12	16	16	16	13	17	15	12	14	15	14	175	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

a : One pup was cannibalized. b : Two pups were cannibalized.

[ 1000 mg/kg/day ]

Parental female number	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	13	12	12	17	16	15	15	16	17	14	16	15	178	12	—	—
No. of pups examined																
Total	13	12	12	16 <sup>a</sup>	16	15	15	16	17	13 <sup>a</sup>	16	15	176	12	—	—
Live	13	12	12	16	15	15	15	16	17	12	16	14	173	—	—	—
Dead	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	3	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

a : One pup was cannibalized.

Appendix 25-1 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 0 mg/kg/day ]

Parental female number	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	16	16	13	15	16	9	12	14	16	13	17	18	175	12	—	—
No. of pups examined																
Total	16	16	13	15	16	9	12	14	16	13	17	18	175	12	—	—
Live	16	16	13	15	16	9	12	14	16	12	17	17	173	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	3	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(11.1)	(0)	(0)	(12.5)	(0)	(0)	(0)	—	12	(2.0)	(4.6)
Live	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	3	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
visceral variations																
Thymic remnant in neck																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(6.3)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.5)	(1.8)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dilatation of ureter																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Bending of ureter																
Total	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(11.1)	(0)	(0)	(6.3)	(0)	(0)	(0)	—	12	(1.5)	(3.5)
Live	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Persistent left umbilical artery																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

Appendix 25-2 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 100 mg/kg/day ]

Parental female number	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	16	16	16	16	16	13	15	12	14	14	14	15	177	12	—	—
No. of pups examined																
Total	16	16	16	16	16	13	15	12	14	14	14	15	177	12	—	—
Live	16	16	16	16	16	13	15	12	14	14	14	14	176	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(6.7)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.6)	(1.9)
Live	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
visceral variations																
Thymic remnant in neck																
Total	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(6.7)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.6)	(1.9)
Live	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dilatation of ureter																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Bending of ureter																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Persistent left umbilical artery																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

Appendix 25-3 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with (2-methylpropenoxyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 300 mg/kg/day ]

Parental female number	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	15	12	16	16	17	13	17	15	14	14	16	14	179	12	—	—
No. of pups examined																
Total	15	12	16	16	16 <sup>a</sup>	13	17	15	12 <sup>b</sup>	14	15 <sup>a</sup>	14	175	12	—	—
Live	15	12	16	16	16	13	17	15	12	14	15	14	175	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(5.9)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.5)	(1.7)
Live	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
visceral variations																
Thymic remnant in neck																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dilatation of ureter																
Total	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(5.9)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.5)	(1.7)
Live	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Bending of ureter																
Total	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(5.9)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.5)	(1.7)
Live	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Persistent left umbilical artery																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

a : One pup was cannibalized. b : Two pups were cannibalized.

Appendix 25-4 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with (2-methylpropenyloxyethyl)trimethylammonium chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 1000 mg/kg/day ]

Parental female number	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	13	12	12	17	16	15	15	16	17	14	16	15	178	12	—	—
No. of pups examined																
Total	13	12	12	16 <sup>a</sup>	16	15	15	16	17	13 <sup>a</sup>	16	15	176	12	—	—
Live	13	12	12	16	15	15	15	16	17	12	16	14	173	—	—	—
Dead	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	3	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(6.3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.5)	(1.8)
Live	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
visceral variations																
Thymic remnant in neck																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dilatation of ureter																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Bending of ureter																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Persistent left umbilical artery																
Total	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(6.3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.5)	(1.8)
Live	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

a : One pup was cannibalized.