

シトラール

(CAS No. 5392405)

試験番号：SR - 9619

試験名：シトラールのラットにおける簡易生殖毒性試験

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表題・試験番号	5
要 約	6
緒 言	7
材料および方法	7
成 績	15
考 察	19
参 考 文 献	21

Figures.....添付

1. Body weight changes of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
2. Food consumption of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
9. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)

Tables..... 添付

1. Experimental design for the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)
2. General appearance of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
3. Body weight changes of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
4. Food consumption of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
5. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
6. Gross findings of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
7. Histopathological findings of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
8. General appearance of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
9. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
10. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
11. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
12. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
13. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
14. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

15. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
16. Gross findings of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
17. Histopathological findings of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
18. Influence of CTL on reproductive ability in the preliminary reproduction toxicity screening test of rats (SR-9619)
19. Influence of CTL on delivery and maternal behavior in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9619)
20. Gross findings of dead pups at birth in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)
21. Influence of CTL on viability of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9619)
22. General appearance of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)
23. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)
24. Gross findings of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)

表 題 シトラールのラットにおける簡易生殖毒性試験

試験番号 SR-9619

要 約

シトラール (CAS No. 5392-40-5) の 40、200および 1000 mg/kg/dayを雄ラットの交配前および交配期間を含む46日間、雌ラットの交配前、交配および妊娠期間、哺育3日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験を実施し、以下の知見が得られた。

1. 雌雄動物の反復投与毒性

- (1) 体重および摂餌量の低値が 1000 mg/kg群の雌雄で認められた。
- (2) 剖検では前胃粘膜の一部肥厚が 1000 mg/kg群の雌で認められ、病理組織学的検査では前胃に扁平上皮過形成、潰瘍および粘膜固有層の肉芽形成が 1000 mg/kg群の雌雄で認められた。
- (3) 以上より、シトラールの反復投与により、1000 mg/kg群で雌雄の体重、摂餌量および剖検あるいは病理組織学的検査に影響が認められたことから、本スクリーニング試験における CTLの反復投与による無影響量 (NOEL) は雌雄共に 200 mg/kg/dayであることが示唆された。

2. 雌雄動物の生殖毒性および次世代の発生毒性

- (1) 生殖能検査、親動物の生殖器の重量および病理組織学的検査、分娩観察および母性行動観察に、シトラール投与による影響は認められなかった。
- (2) 新生児の体重推移では、1000 mg/kg群の雌雄の体重の低値が認められた。
- (3) 新生児の生存性、一般状態および剖検では、シトラール投与による影響は認められなかった。
- (4) 以上より、1000 mg/kg群で新生児の体重の低値が認められたことから、本スクリーニング試験におけるシトラールの親世代の生殖に対する無影響量 (NOEL) は 1000 mg/kg/day、次世代の発生に対する無影響量 (NOEL) は 200 mg/kg/dayであることが示唆された。

緒 言

シトラール (CAS No. 5392-40-5) は、レモングラス油、バックハウシア油など多種類の精油中に存在し、精油から単離あるいは化学合成によって得られ、1900年代以降、石鹸・洗剤・化粧品などの香料として、1960年代には食品添加物としても一般に使用されている物質である^{1, 2)}。今回、OECD既存化学物質の点検事業の一環として、シトラールを雄ラットの交配前および交配期間を含む 46日間、雌ラットの交配前、交配および妊娠期間、哺育 3 日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験を実施したので、その成績を報告する。

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

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は、 から提供された シトラール (CAS No. 5392-40-5、Citral、以下 CTLと略す。Lot番号： 純度：98.20%) である。被験物質は、レモンの香りを有する水に不溶な淡黄色透明の液体 (比重 0.889) で、アルデヒドであり、酸化されやすいなど、反応性に富む。被験物質は常温 (24~27°C) で直射日光を遮断し、密閉して保管した (製品安全データシート、被験物質の分析結果、Appendix 1、2)。なお、投与終了後の被験物質の純度を製造業者が分析し、被験物質は投与期間中安定であったことが確認された (連絡文書、Appendix 3)。

2. 投与量の設定

投与量は、本試験の用量設定試験 (SR-9619P) の結果ならびに文献からの情報を参考に設定した。用量設定試験では、各3例の雌雄ラットにトウモロコシ油を溶媒として10、30、100、300および1000 mg/kg/dayを14日間反復投与したところ、1000 mg/kg群で雄2例、雌3例全例に前胃粘膜の一部肥厚が認められた。雌ラットに交配前2週間から哺育21日までCTLを投与した試験 (投与量: 50、160、500 mg/kg/day、A. M. Hoberman et al., 1989³⁾) では、160および500 mg/kg群で母動物の体重増加量および摂餌量の減少が認められ、500 mg/kg群で出生児および胎児の体重の低値あるいは低値傾向が認められた。50 mg/kg群では母動物ならびに出生児および胎児に影響は認められなかった。また、ラットの胎児の器官形成期にCTLを投与した試験 (投与量: 60、125、250、500、1000 mg/kg/day、A. C. M. A. Nogueira et al., 1995⁴⁾) では、60および125 mg/kg群で吸収胚率の増加、250 mg/kg以上の群で妊娠率の減少、125、250および1000 mg/kg群で生存胎児数の減少、125 mg/kg以上の群で胎児体重の低値が認められた。これらのことから、最高用量は親動物に対して毒性を与えるが死亡させない量として1000 mg/kg/dayとし、上記の文献から次世代への無影響量を考慮し、以下、公比5で、200および40 mg/kg/dayを設定した。さらに媒体であるトウモロコシ油を投与する対照群を設け、計4群とし、動物数は1群当たり雌雄各12匹とした (Table 1)。

3. 被験物質の調製方法

被験物質の調製は用時とし、投与期間中毎日、当日投与する調製液を以下の方法で調製した。被験物質を精秤し、8、40および200 mg/mlの濃度となるようにトウモロコシ油 (Lot No. 6668、7662、片山化学工業株式会社) に溶解した。この調製方法によるCTL調製液は規定の濃度であり、調製後5時間安定であることがエヌシ一技研株式会社により確認された (報告書No. 化安-NC-001、Appendix 4)。

4. 試験動物

生後8週齢のCrj:CD (SD) 系のSPFラット (雄: 55匹、体重範囲 233~275 g、雌: 55匹、体重範囲 165~198 g) を日本チャールス・リバー株式会社から受け入れ、14日間の馴化飼育を行った。検疫並びに馴化期間中、一般状態観察を1日1回、体

重測定を期間中3回実施し、順調な発育を示した動物を試験に用いた。なお、雌については、10日間の性周期検査を行い、性周期に異常の認められない動物を用いた。

5. 飼育環境条件

動物は、温度 23 ± 3 °C、湿度 $RH55 \pm 10\%$ 、換気回数 10~15回/時間および照明時間12時間（午前8時から午後8時まで点灯）に設定されたバリアシステムの飼育室 302号室において、ブラケット式金属製金網床ケージ（260W×380D×180H, mm）を用いて飼育した。ただし、妊娠17日から金属網床のかわりに実験動物用床敷（ホワイトフレック、日本チャールス・リバー株式会社）を敷いたステンレス製受皿を使用した。ケージ当たりの収容匹数は、群分け前は2匹以内、群分け後は1匹、交配中は雌雄各1匹、妊娠期間中は1母動物、哺育期間中は1腹とした。ケージの交換は2週に1回の頻度で行った。

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

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

飼料の分析および検査は財団法人日本食品分析センター（分析試験成績書：第 49031070-001号、第 49061093-001号、Appendix 5、6）およびオリエンタル酵母工業株式会社（微生物検査結果書：No. 96G01-004および No. 96G01-007の全3頁の3、Appendix 7、8）で実施し、各混入物質について当社 SOPの許容範囲内であることを確認した。飲料水の水質検査は日本衛生株式会社（水質検査結果表：No. 080095、080883、Appendix 9、10）で実施し、当社SOPの水質基準の範囲内であることを確認した。

6. 群分けおよび個体識別

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

動物の識別は、受け入れ時に油性フェルトペンを用いて尾部にケージ内識別を行い、群分け時に入墨により動物番号の上1桁（群識別）を右耳に、下2桁（個体識別）を左耳に記入して行った。ケージには性別毎に色分けしたカードに試験番号、

試験群および動物番号を明記して標示した。出生児については油性フェルトペンを用いて背部に雄は青色、雌は紫色で動物番号を記し、ケージ内識別を行った。

7. 投与方法

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

投与期間は、雄については交配前14日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例については投与46日まで、雌については交配前14日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間および哺育3日までの期間とした。なお、交尾不成立例については雌雄共に交配期間終了までとした。

投与時刻は、午前9時から午後1時の間とした。

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

投与は10週齢から開始し、投与開始時の平均体重（体重範囲）は雄で 356.5 g（315～391 g）、雌で 230.0 g（207～254 g）であった。

8. 観察、測定および検査項目

1) 雄動物について

(1) 一般状態観察

全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で、視診および触診により行動、外観などを観察した。発現した症状についてはその種類を記録するとともに可能な限り持続時間を記録した。

(2) 体重測定

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

(3) 摂餌量測定

全例について、投与1日（投与開始日の投与前）、投与2、5、7、10、14日、その後は交配期間を除き体重測定日と同じ日（投与終了日を含む）に電子天秤を

用いて測定した。適当量をケージ毎にセットし、翌日に残量を測定し、1匹当たりの1日分の摂餌量を算出した。

(4) 剖検および器官重量測定

交尾成立例は投与46日の翌日に、交尾不成立例は交配期間終了の翌日にエーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官および組織を肉眼的に観察した。摘出器官のうち、精巣および精巣上体（左右）の重量を電子天秤を用いて測定し、器官体重重量比〔(器官重量/動物体重)×100〕を算出した。

(5) 病理組織学的検査

剖検時に全例について、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳（大脳・小脳）、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、膵臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、眼球、ハーダー腺、胸骨および大腿骨（骨髄を含む）、脊髄（頸部）、骨格筋（外側広筋）、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精巣、精巣上体、精囊（凝固腺を含む）および前立腺を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。なお、眼球およびハーダー腺の固定・保存にはデビッドソン液を、精巣および精巣上体の固定にはブアン液を、保存には70%エタノールを使用した。摘出器官のうち、全例の胃（前胃・腺胃・境界縁）、精巣および精巣上体について、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

2) 雌動物について

(1) 一般状態観察

全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で、視診および触診により行動、外観などを観察した。発現した症状についてはその種類を記録するとともに可能な限り持続時間を記録した。

(2) 体重測定

全例について、投与1日（投与開始日の投与前）、投与2、5、7、10、14日、妊娠0、1、3、5、7、10、14、17、20日、哺育0、1および4日に、また、交配期間中（雄と同居中の場合）は相手雄の測定日と同じ日に電子天秤を用いて測定

した。体重増加量〔（投与14日体重－投与1日体重）、（妊娠20日体重－妊娠0日体重）および（哺育4日体重－哺育0日体重）〕、およびそれぞれの体重増加量に対応した体重増加率〔（体重増加量／投与1日体重）×100、（体重増加量／妊娠0日体重）×100および（体重増加量／哺育0日体重）×100〕を算出した。

(3) 摂餌量測定

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

(4) 剖検および器官重量測定

交尾成立例は哺育4日に、妊娠25日まで分娩の認められない例は妊娠26日に、全哺育児死亡例は発見後直ちに、交尾不成立例は交配期間終了の翌日にエーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、妊娠動物については子宮の着床痕および卵巣の妊娠黄体を計数した。全例について、摘出器官のうち、卵巣（左右）の重量を電子天秤を用いて測定し、器官体重重量比〔（器官重量／動物体重）×100〕を算出した。

(5) 病理組織学的検査

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

摘出器官のうち、全例の胃（腺胃・前胃・境界縁）および卵巣、No.452の肝臓についてパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

3) 雌雄動物の生殖および次世代の発生について

(1) 性周期検査

雌全例について、投与前10日から交尾成立までの連日、ギムザ染色による膣垢塗抹標本を作製し、光学顕微鏡下で性周期段階（発情前期、発情期前期、発情期後期、発情後期および発情休止期）の判定を行い、性周期の異常の有無（正常または発情休止期継続、不規則発情）を検索した。

(2) 生殖能検査

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

(3) 分娩および母性行動観察

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

(4) 新生児の一般状態観察および生存性

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

(5) 新生児の体重測定

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

(6) 新生児の剖検

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

9. 統計処理

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

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

なお、対照群との検定については、危険率5%以下を統計学的に有意とした。

成 績

1. 雄動物の反復投与毒性

(1) 一般状態観察

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

いずれの群にも異常は認められなかった。

(2) 体重推移

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

投与 1 から 46 日の体重増加量および体重増加率の低値が 1000 mg/kg 群で認められた。

(3) 摂餌量

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

摂餌量の低値が 1000 mg/kg 群で投与 5 日に認められた。

(4) 器官重量

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

いずれの群にも、精巣および精巣上体の重量および体重重量比に対照群と比較して有意差は認められなかった。

(5) 剖検

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

1000 mg/kg 群で右の腎盂の拡張が 2 例に、右の精巣および精巣上体の萎縮が 1 例に、右の精巣上体に黄白色腫瘍が不妊の 1 例に認められた。

40 および 200 mg/kg 群ならびに対照群では異常は認められなかった。

(6) 病理組織学的検査

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

胃では、前胃に軽度の扁平上皮過形成が 1000 mg/kg 群で 2 例に認められた。

精巣では、精細管の軽度の萎縮が対照群で 1 例（左）、1000 mg/kg 群で 1 例（左右）に認められ、このうち 1000 mg/kg 群の例では右の精巣上体に軽度の管内精子減少も認められた。また、剖検時に右の精巣および精巣上体に萎縮がみられた 1000 mg/kg 群の別の 1 例では、病理組織学的検査で右の精巣に精細管の重度の萎縮ならびに右の精巣上体に重度の管内精子減少が認められた。剖検で右の精巣上体に黄白色腫瘍がみられた 1000 mg/kg 群の不妊の 1 例では、右の精巣上体に精子肉芽腫が認められた。

2. 雌動物の反復投与毒性

(1) 一般状態観察

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

1000 mg/kg群の1例で投与7日の投与後13分から54分間自発運動の減少が認められたが、同例は投与8日以降、妊娠および哺育期間を通して一般状態に異常は認められなかった。

妊娠期間では、1000 mg/kg群の1例で妊娠9および10日の投与後4あるいは6分から約40分間流涎が認められた。

哺育期間では、対照群の1例で哺育1日に全哺育児の死亡がみられたが、CTL投与群では異常は認められなかった。

(2) 体重推移

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

交配前期間、妊娠期間および哺育期間を通して、いずれの群にも体重推移に有意差は認められなかったが、1000 mg/kg群で妊娠期間の体重が対照群と比較して低値で推移し、体重および体重増加量に有意差は認められないものの、対照群と比較して妊娠20日に約14gの低値がみられた。

(3) 摂餌量

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

交配前期間では、低値が1000 mg/kg群で投与5日に認められた。

妊娠期間では、対照群と比較して有意差は認められなかった。

哺育期間では、低値が1000 mg/kg群で哺育4日に認められた。

(4) 器官重量

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

いずれの群にも卵巣の重量に対照群と比較して有意差は認められなかった。

(5) 剖検

剖検の成績を Table 16、INDIVIDUAL DATA 17-1~17-4、Photo. M-1、M-2に示した。

胃では、前胃粘膜の一部肥厚が1000 mg/kg群で10例に認められた (Photo. M-2)。

肝臓では、尾状葉乳頭突起の暗赤色化が1000 mg/kg群で1例に認められた。

(6) 病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 17、INDIVIDUAL DATA 18-1~18-4、25-1~25-4、Photo. H-1~H-4) に示した。

胃では、前胃に軽度の扁平上皮過形成が 1000 mg/kg群で 4 例、中等度の扁平上皮過形成が 1000 mg/kg群で 6 例に認められた (Photo. H-2~H-4)。また、全哺育児が死亡したことにより屠殺した対照群の 1 例に軽度の扁平上皮過形成が認められた。この扁平上皮過形成の発現について、1000 mg/kg群に対照群と比較して有意差が認められた。他に 1000 mg/kg群では前胃に、粘膜筋板までの炎症を伴う軽度の潰瘍が 2 例、粘膜固有層の軽度の好中球浸潤が 2 例、粘膜固有層の軽度の肉芽形成が 6 例に認められた (Photo. H-3、H-4)。

他に剖検で肝臓の尾状葉乳頭突起に暗赤色化がみられた 1000 mg/kg群の例で、同部位に小葉中心性の中等度の壊死が認められた。

3. 雌雄動物の生殖毒性および次世代の発生毒性

(1) 生殖能検査

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

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

性周期観察では、投与前期間と投与期間の性周期に CTL投与との関連を示唆する変化は認められなかった。なお、発情休止期の継続が投与期間に 40および 1000 mg/kg群の各 1 例で認められ、40 mg/kg群の例は交尾不成立であった。一方、1000 mg/kg群の例は交尾が成立したが、剖検の結果、受胎は認められなかった。これらの例も含め、交尾不成立例は 40 mg/kg群で 1 組、不妊例は 40および 1000 mg/kg群で各 2 組に認められた。

(2) 分娩および母性行動観察

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

着床率の高値が 40 mg/kg群で認められた。

その他、妊娠黄体数、着床痕数、総出産児数、分娩率、出産確認時生存児数、出生率、出生児の性比、出産確認時死亡児数、妊娠期間、出産率および哺育 4 日時哺育率については、対照群と比較して有意差は認められなかった。

いずれの群でも分娩異常例は認められなかった。

哺育異常として、哺育1日に全哺育児死亡例が対照群の1例にみられたが、CTL投与群では異常は認められなかった。

分娩終了時に死亡児が対照群で雄5例および雌9例に、40 mg/kg群で雌4例および性別不明1例に、1000 mg/kg群で雄5例および雌1例に認められたが、これらの例に剖検で異常は認められなかった。

(3) 新生児の生存性

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

いずれの群にも、対照群と比較して有意差は認められなかった。

(4) 新生児の一般状態観察

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

雌雄ともに CTL投与との関連を示唆する症状は認められなかった。なお、認められた症状は以下の通りであった。

死亡あるいは不明例が対照群で雌3例、40 mg/kg群で雄1例、200 mg/kg群で雄1例および雌2例、1000 mg/kg群で雄1例および雌3例に、尾の外傷および暗赤色化が 40 mg/kg群で雌2例に認められた。

(5) 新生児の体重推移

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

1000 mg/kg群の雌雄で生後0、1および4日の体重に低値が認められ、雄では生後0から4日の体重増加量および増加率に、雌では体重増加量に有意差が認められた。

(6) 新生児の剖検

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

死亡例では剖検で異常は認められなかった。

生後4日の剖検では 200 mg/kg群で腎盂の拡張が1例に、尿管の拡張が2例に認められた。他に外表所見として尾の外傷および暗赤色化が 40 mg/kg群で2例に認められた。

考 察

CTLの 40、200および 1000 mg/kg/dayを雄ラットの交配前および交配期間を含む 46日間、雌ラットの交配前、交配および妊娠期間、哺育 3 日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験を実施した。

一般状態では、1000 mg/kg群の雌で自発運動の減少および流涎が認められた。しかし、これらの症状は、それぞれ 1 例のみの、かつ投与期間中 1 日あるいは 2 日という発現であり、偶発的な出現と考えられた。

体重推移では 1000 mg/kg群の雄で体重増加量および増加率の低値が認められた。また、1000 mg/kg群の雌では有意差は認められないものの、妊娠期間の体重が対照群と比較して低値で推移し、妊娠 20 日に約 14 g の低値がみられた。また、1000 mg/kg群の雌雄では摂餌量の低値も一過性ながら認められており、これら体重および摂餌量の低値は CTL投与による影響と考えられた。

剖検では 1000 mg/kg群の雌で前胃粘膜の一部肥厚が認められ、病理組織学的検査では前胃に扁平上皮過形成、潰瘍、粘膜固有層の肉芽形成が認められた。1000 mg/kg群では雄でも病理組織学的検査で前胃に扁平上皮過形成が認められており、CTLが前胃の粘膜に対して刺激性のあることが示唆された。

他に剖検および病理組織学的検査で 1000 mg/kg群にみられた精巣および精巣上体の萎縮、精細管の萎縮、精巣上体管内の精子減少、精子肉芽腫は対照群と比較して発現に有意差は認められない、あるいは自然発生的な発現例数であり、CTL投与による影響とは考えられなかった。また、1000 mg/kg群の雌 1 例でみられた尾状葉乳頭突起の暗赤色化ならびに小葉中心性の壊死は、肝臓の他の葉にはみられない限局した変化であり、CTL投与による影響とは考えられなかった。

以上、CTL反復投与による影響として、1000 mg/kg群の雌雄で体重推移、摂餌量および前胃の胃粘膜に及ぼす影響が認められたことから、本スクリーニング試験におけるCTLの反復投与による無影響量 (NOEL) は雌雄共に 200 mg/kg/dayであることが示唆された。

生殖能検査では着床率の高値が 40 mg/kg群で認められたが、CTL投与群で黄体数が少ない傾向があるものの、有意差は認められず、着床数にも影響は認められないこと

から、CTL投与による変化とは考えられなかった。生殖器の病理組織学的検査においても CTL投与による影響は認められなかった。なお、交尾不成立例および不妊例の生殖器にそれらの原因を示唆する病理組織学的所見は認められなかった。1000 mg/kg群の雄の不妊例では精巣上体に精子肉芽腫が認められたが、片側性であり、不妊の原因となる所見とは考えられなかった。

その他、雌の性周期、雌雄の交尾、受胎および生殖器（精巣、精巣上体および卵巣）の重量に対して CTL投与による影響は認められなかった。

母動物の分娩および哺育に対して、CTL投与による影響は認められなかった。

新生児の観察では、1000 mg/kg群で新生児の雌雄に体重の低値がみられ、CTL投与による影響と考えられた。さらに、同群では、母動物の妊娠期間体重が対照群と比較して低値であり、新生児体重の低値は哺育0日から有意に認められた。Hoberman らが実施した、雌ラットへの交配前2週間から哺育21日までの CTL投与試験³⁾でも、500 mg/kg群において出生児体重の有意な低値や妊娠20日胎児体重の軽度な低値が認められた。これらのことから、本試験では、母動物への CTL投与により、哺育期間だけでなく胎生期の発育にも影響を及ぼした可能性が考えられた。

また、本試験では、妊娠率、着床率、分娩率、出生率および新生児生存率に CTL投与による影響は認められず、着床や胚胎児および出生児の生存性に悪影響を及ぼすことはなかった。これは Hoberman ら³⁾の試験でも同様であった。一方、ラットの胎児の器官形成期に CTLを投与した試験 (Nogueira ら⁴⁾) においては着床の阻害や胚胎児の損失が認められ、本試験および Hoberman らの試験結果とは異なった。この差異、すなわち、本試験でF₁世代の生存性に影響が認められなかったのは、投与期間の違いによると考えられ、Nogueira らの論述⁴⁾のように交配前からの反復投与によりシトラルの代謝誘導あるいは耐性が生じたためではないかと思われた。

その他に出生児の一般状態および剖検において CTL投与による影響は認められなかった。

以上より、1000 mg/kg群で新生児の体重に低値が認められたことから、本スクリーニング試験における CTLの親世代の生殖に対する無影響量 (NOEL) は 1000 mg/kg/day、次世代の発生に対する無影響量 (NOEL) は 200mg/kg/dayであることが示唆された。

参考文献

- 1) 厚生省提供資料—D. L. J. Opdyke, "Fragrance raw materials monographs,"
p. 259-263.
- 2) 食品添加物公定書注解編集委員会編：「第二版 食品添加物公定書注解」
金原出版株式会社, p. 378-381, 1968.
- 3) A. M. Hoberman et al. (1989). Oral general reproduction study of citral
in female rats. *The Toxicologist*, 9 : 271.
- 4) A. C. M. A. Nogueira et al. (1995). Study on the embryofeto-toxicity of
citral in the rat. *Toxicology*, 96 : 105-113.

Figures

- Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Figure 9. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)

Tables

- Table 1. Experimental design for the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)
- Table 2. General appearance of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 5. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 6. Gross findings of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 7. Histopathological findings of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

- Table 8. General appearance of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 9. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 10. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 11. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 12. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 13. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 14. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 15. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 16. Gross findings of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 17. Histopathological findings of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)
- Table 18. Influence of CTL on reproductive ability in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9619)
- Table 19. Influence of CTL on delivery and maternal behavior in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9619)
- Table 20. Gross findings of dead pups at birth in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)
- Table 21. Influence of CTL on viability of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9619)
- Table 22. General appearance of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)
- Table 23. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)
- Table 24. Gross findings of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)

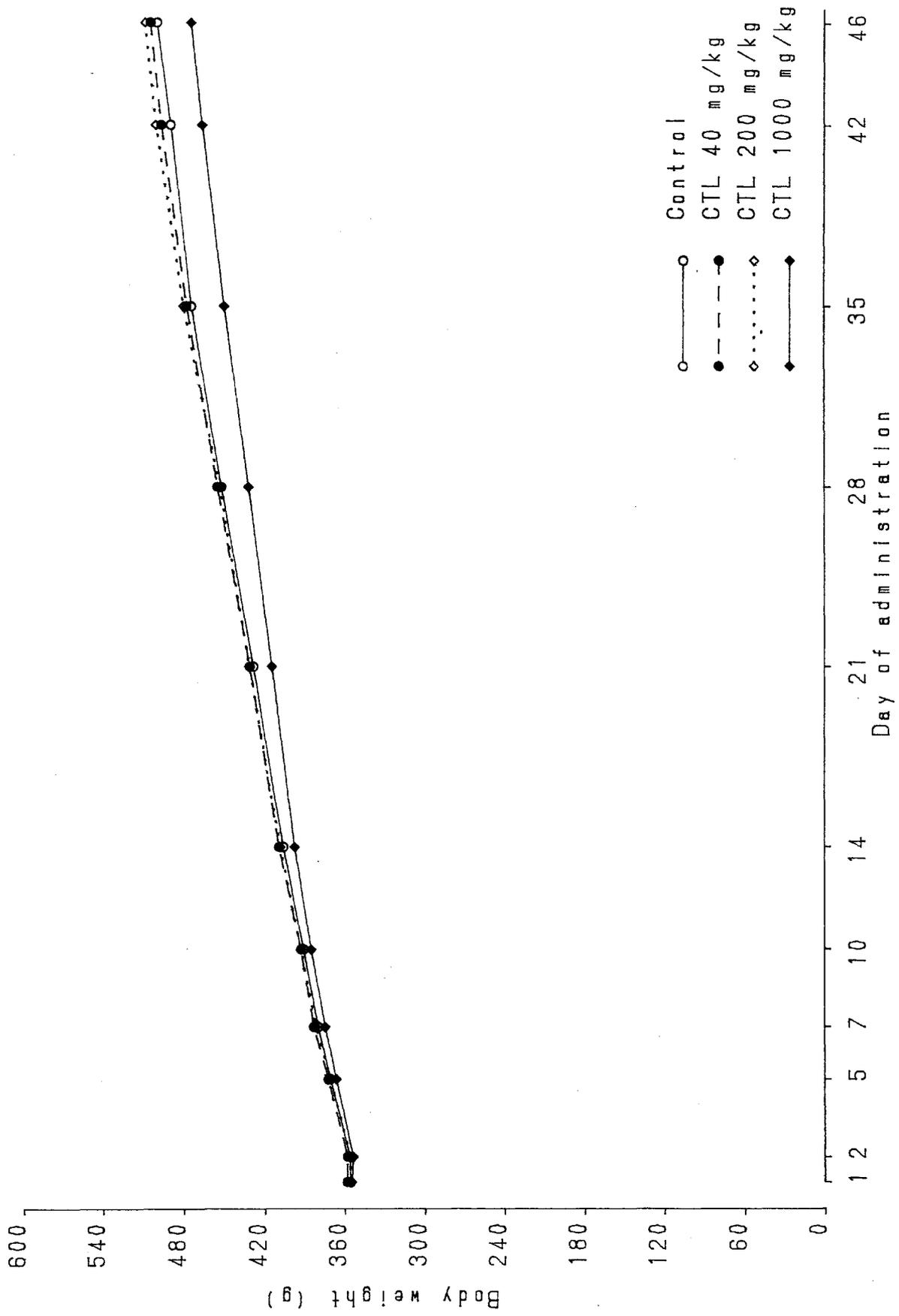


Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

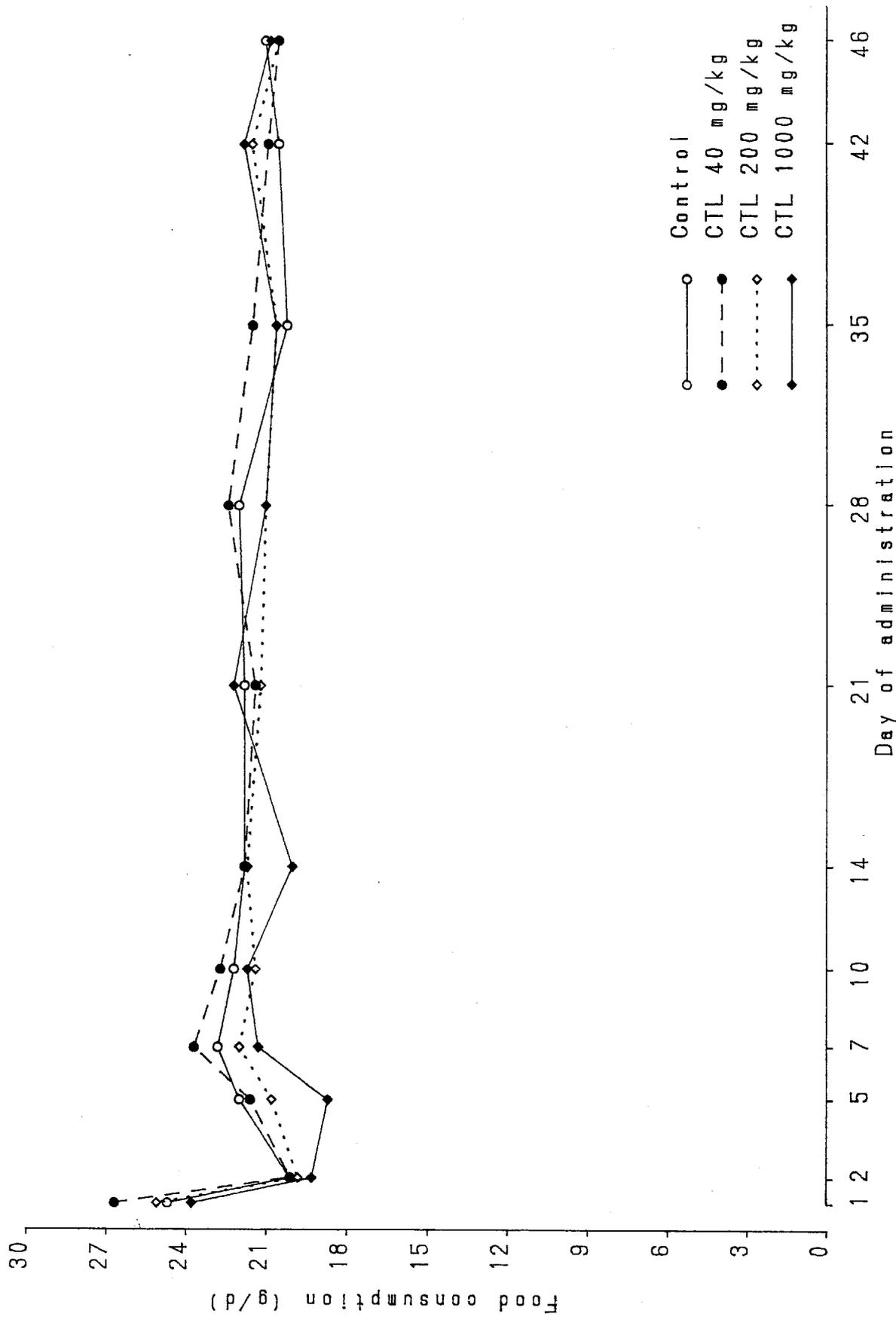


Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

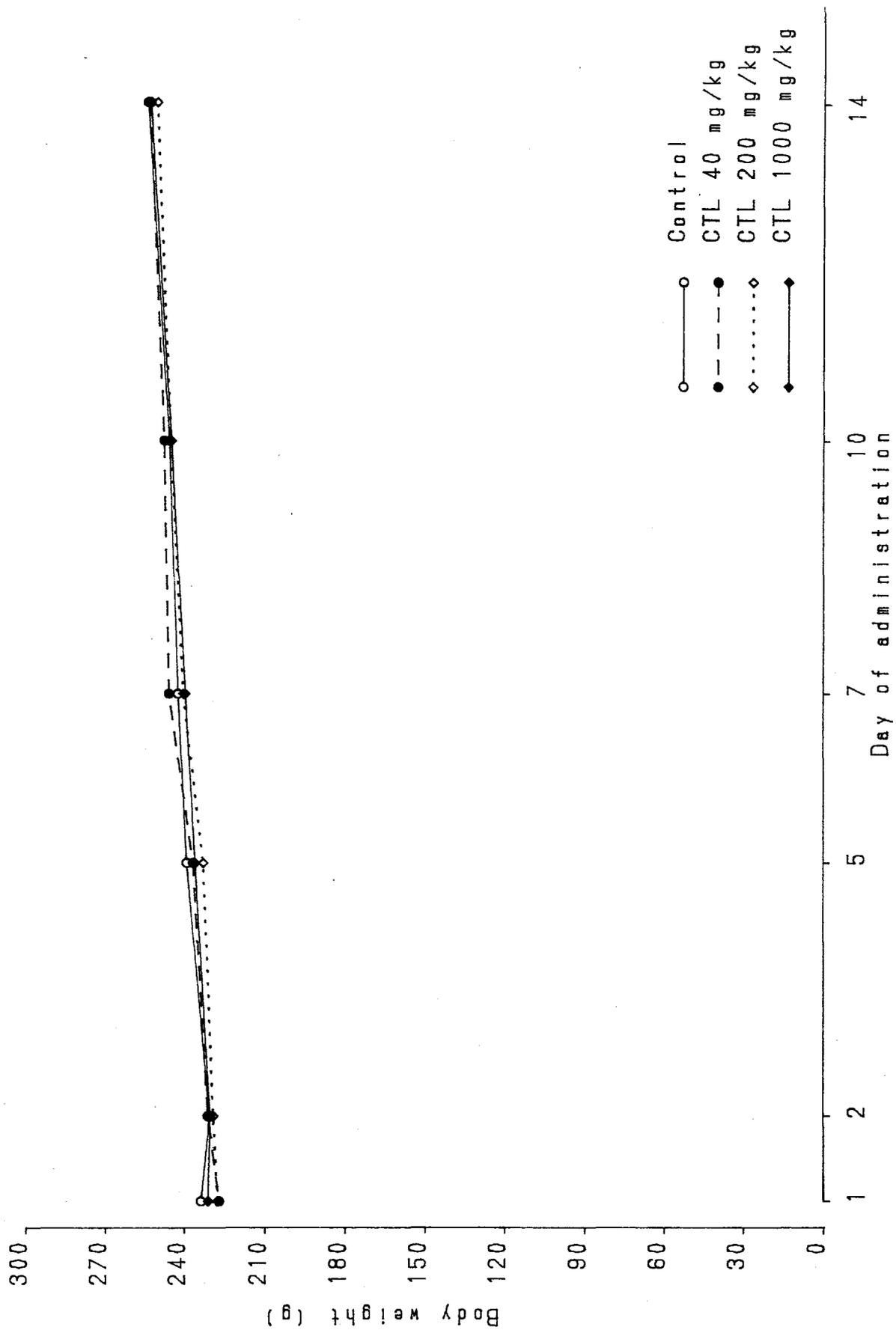


Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

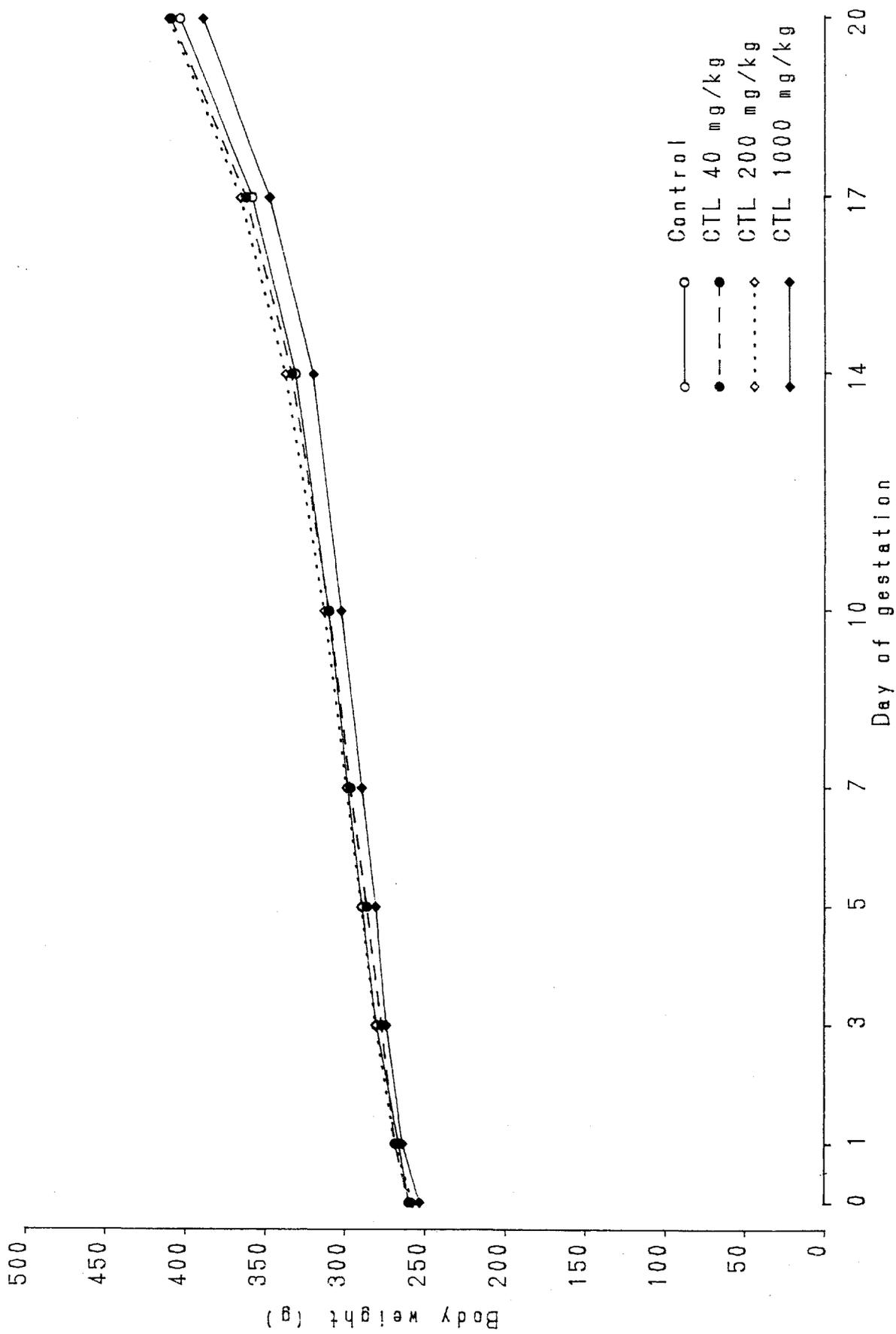


Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

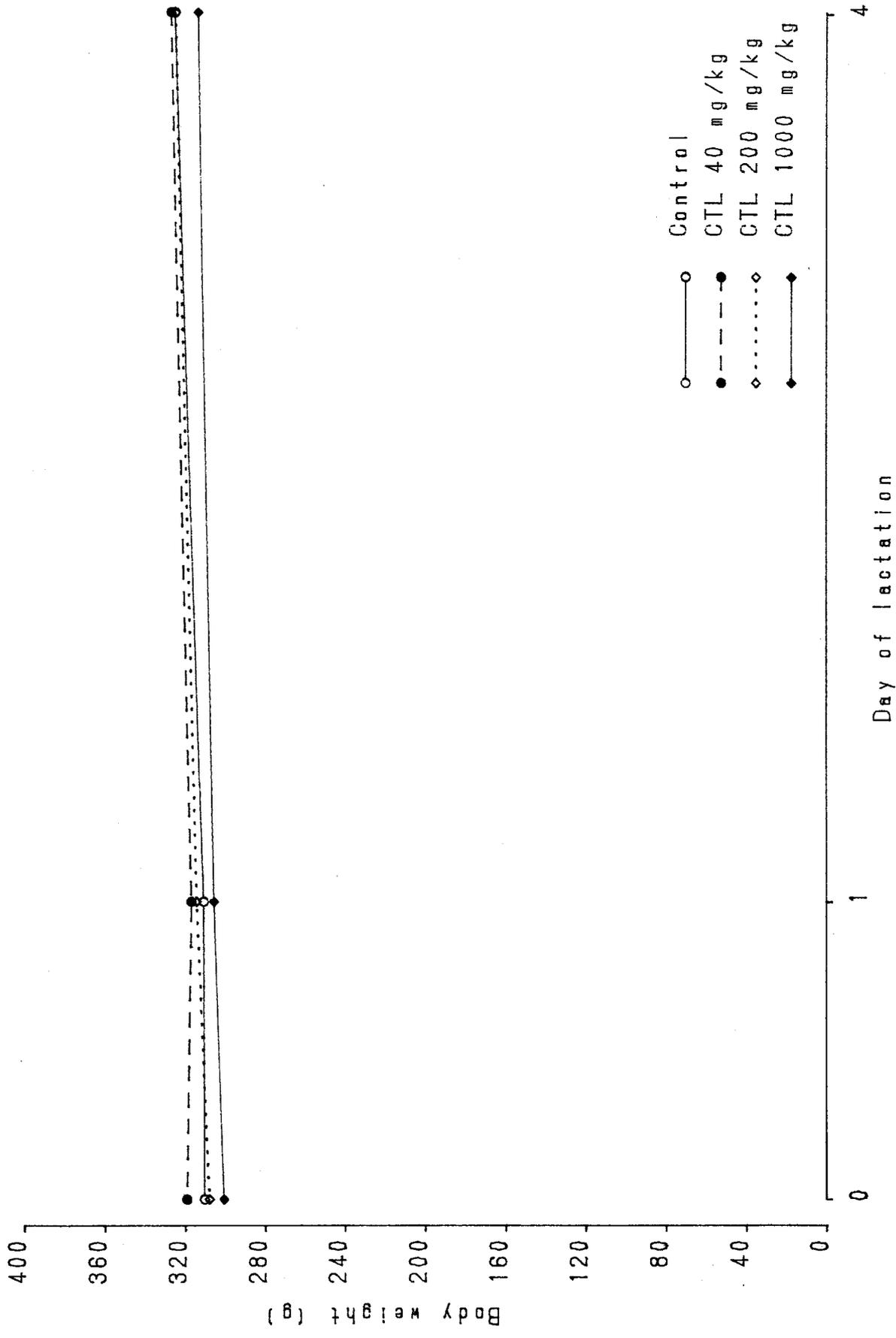


Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

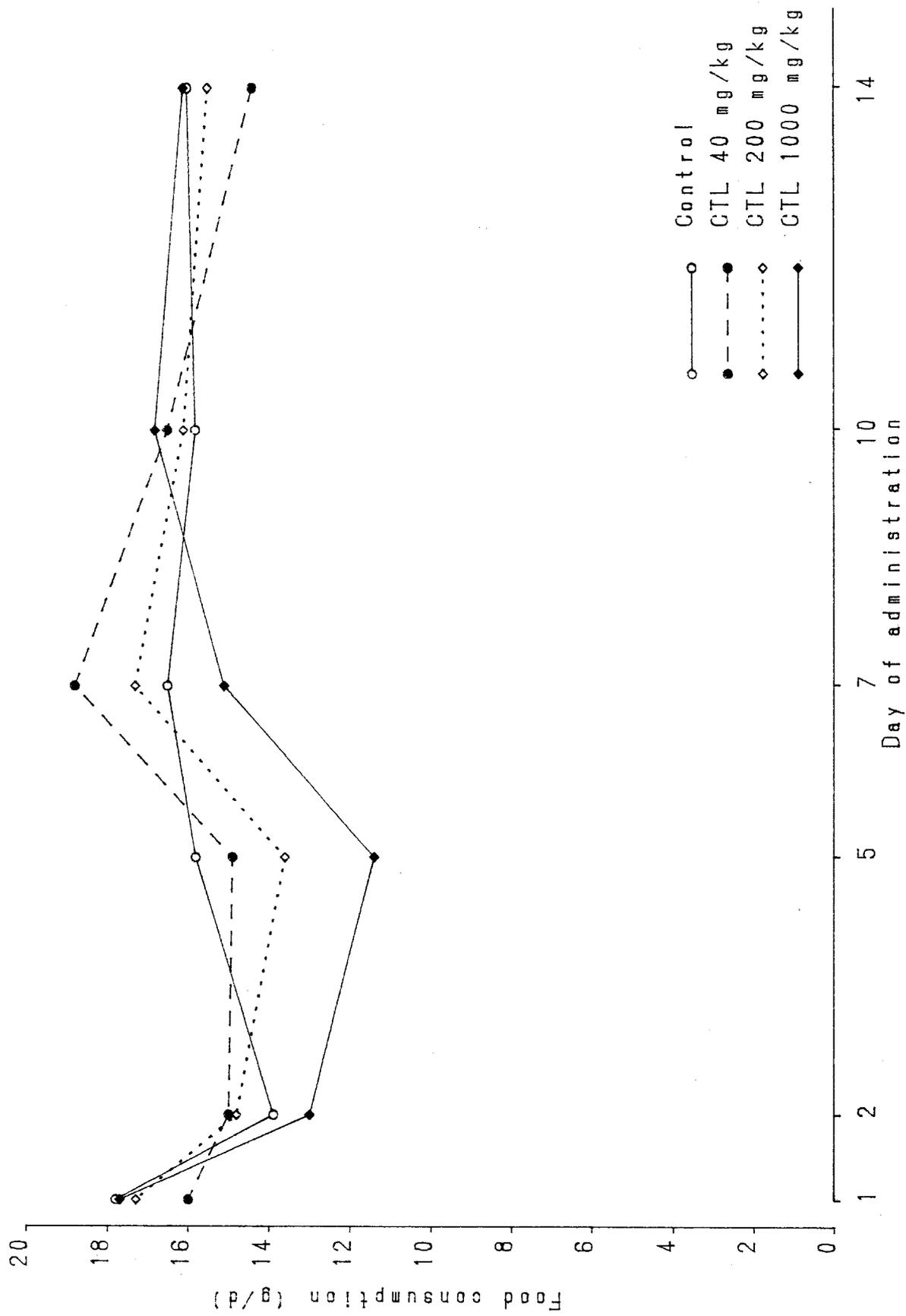


Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

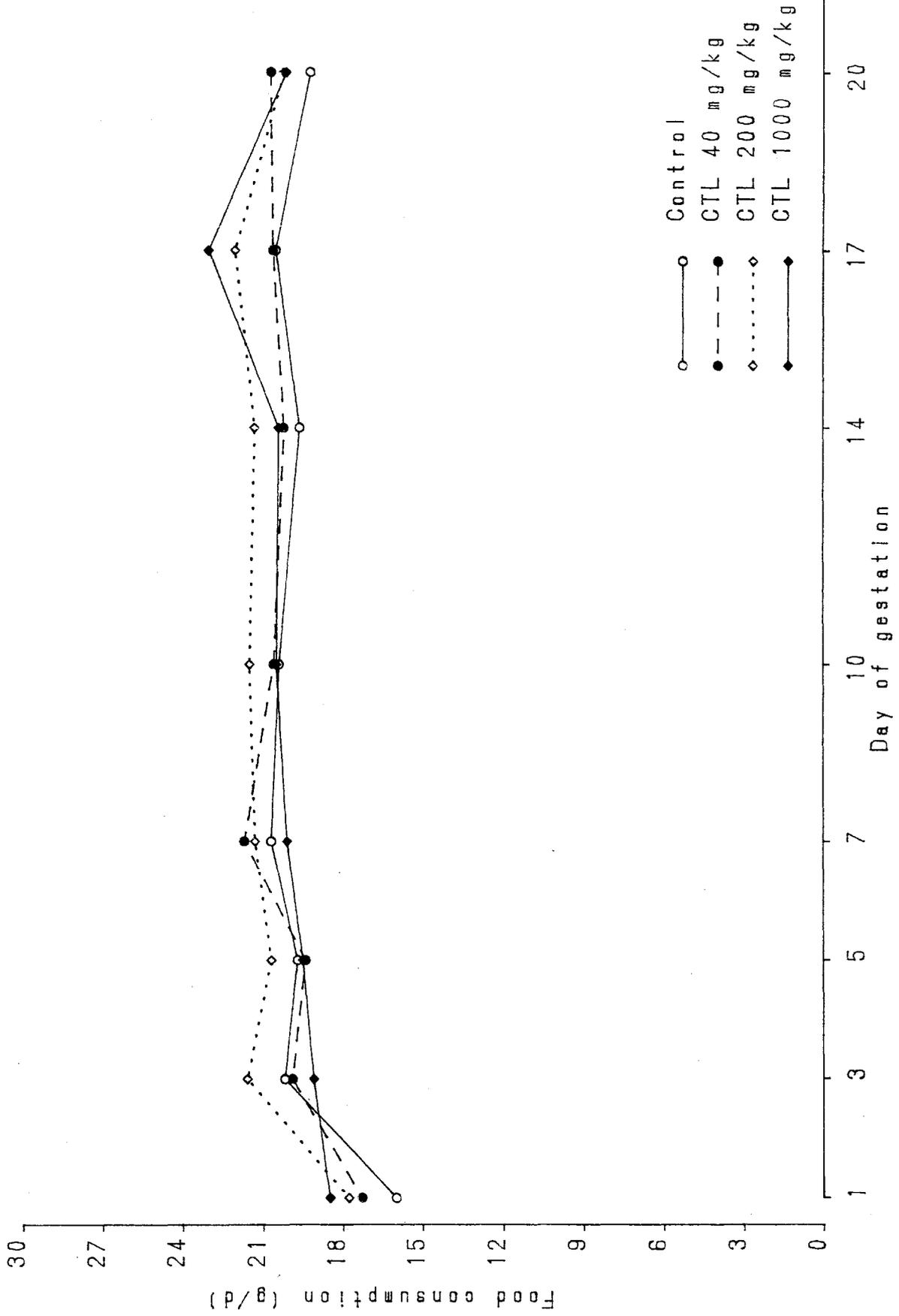


Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

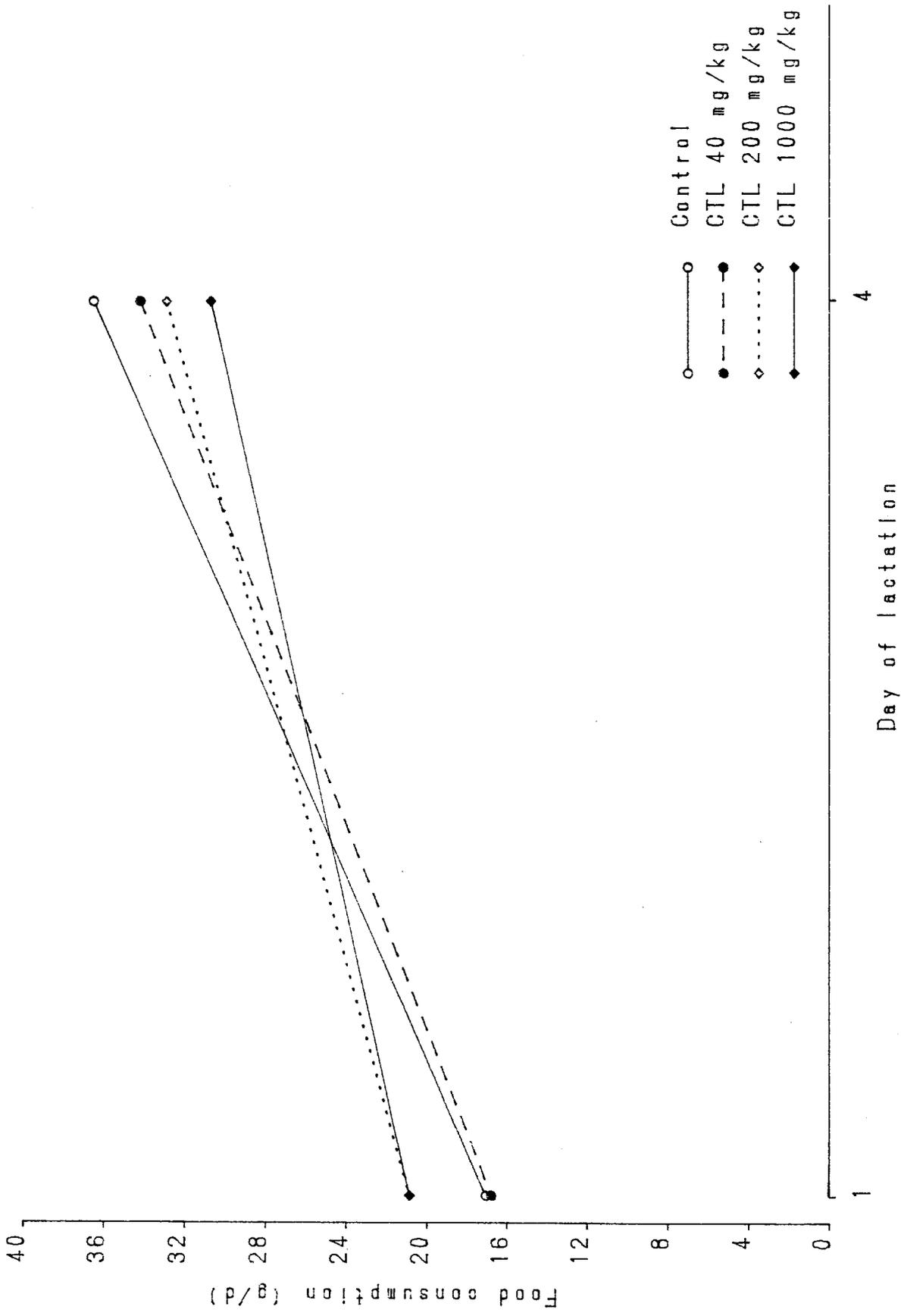


Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

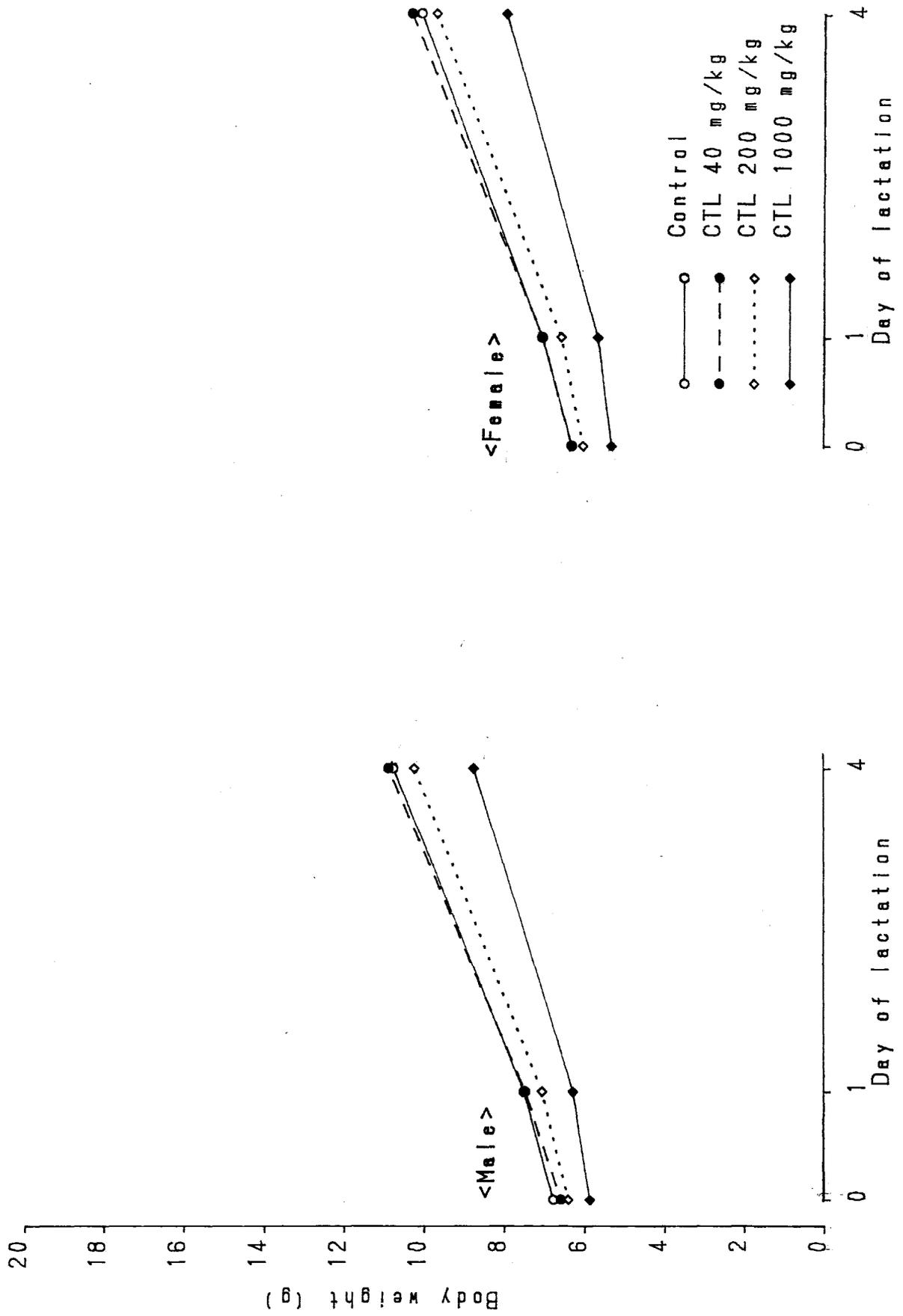


Figure 9. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)

Table 1. Experimental design for the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)

Group	Concentration of CTL (w/v %)	Volume (ml/kg)	No. of animals ^a	
			Male	Female
^b Control	0	5	12	12
^c CTL 40 mg/kg	8	5	12	12
CTL 200 mg/kg	40	5	12	12
CTL 1000 mg/kg	200	5	12	12

a: CTL (citral) was dosed orally to males for 46 days including before and during the mating period, and to females from day 14 before mating to day 3 of lactation.

b: Control was dosed with corn oil.

c: CTL was dissolved in corn oil.

Table 2. General appearance of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Item	CTL (mg/kg)			
	Control	40	200	1000
No. of animals examined	12	12	12	12
Abnormal findings	^a 0	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.

Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Group	No. of animals	Day of administration											Body weight gain	
		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46	Day 1-46	% a
Control	12	b											143.833	40.235
		356.0 19.6	356.1 17.7	370.8 21.9	380.1 25.1	391.0 27.0	405.8 30.4	428.1 30.9	451.6 34.6	473.8 37.6	489.5 41.7	499.8 41.9	24.450	5.270
CTL 40 mg/kg	12	358.4 15.1	358.1 14.3	372.5 15.3	383.2 16.7	393.0 17.8	408.8 19.2	430.8 21.6	454.4 29.9	(11)c 36.1	(11) 42.4	(11) 41.5	(11) 34.645	(11) 9.119
		477.5 496.6	504.7	144.636	40.116									
CTL 200 mg/kg	12	356.3 20.1	356.0 18.8	370.9 19.8	381.7 21.5	392.9 23.1	408.2 27.0	431.3 27.6	452.9 29.4	479.9 32.2	500.5 33.4	508.6 33.1	152.333 21.563	42.790 5.934
		479.9 500.5	508.6	152.333	42.790									
CTL 1000 mg/kg	12	355.2 15.9	353.9 16.6	366.5 17.1	374.8 17.3	385.2 18.5	397.3 19.1	414.2 19.1	431.6 20.2	449.6 19.2	465.8 22.3	474.1 23.6	118.917* 16.020	33.528* 4.498
		474.1 500.5	508.6	152.333	42.790									

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

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

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

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

Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Group	No. of animals	Day of administration										
		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46
Control	12	a										
		24.7 2.9	20.1 2.6	22.0 2.4	22.8 2.5	22.2 2.7	21.8 3.2	21.8 1.8	22.0 2.7	20.2 1.9	20.5 2.6	21.0 2.3
CTL 40 mg/kg	12							(10)b	(11)	(11)	(11)	(11)
		26.7 1.7	20.1 2.4	21.6 2.2	23.7 2.6	22.7 3.5	21.8 2.2	21.4 2.8	22.4 2.9	21.5 3.3	20.9 3.2	20.5 2.3
CTL 200 mg/kg	12	25.1 2.2	19.8 1.9	20.8 1.9	22.0 2.5	21.4 1.9	21.7 2.2	21.2 1.8	21.0 2.8	20.6 2.1	21.5 2.3	20.5 1.9
									(10)			
CTL 1000 mg/kg	12	23.8 2.4	19.3 2.6	18.7** 2.2	21.3 2.2	21.7 1.8	20.0 2.2	22.2 3.2	21.0 2.5	20.6 2.2	21.8 2.7	20.8 2.6

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

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

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

Table 5. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Group	No. of animals	Body weight g	Testis				Epididymis			
			Right		Left		Right		Left	
			g	%	g	%	g	%	g	%
Control	12	502.5 ^a	1.720	0.344	1.698	0.339	0.687	0.138	0.667	0.134
		41.4	0.142	0.029	0.166	0.033	0.071	0.016	0.070	0.016
CTL 40 mg/kg	11	506.2	1.737	0.346	1.697	0.338	0.676	0.135	0.650	0.128
		43.6	0.098	0.036	0.102	0.034	0.063	0.014	0.064	0.016
CTL 200 mg/kg	12	512.5	1.783	0.349	1.759	0.343	0.703	0.139	0.685	0.134
		33.4	0.169	0.029	0.152	0.025	0.047	0.009	0.051	0.011
CTL 1000 mg/kg	12	475.8	1.593	0.336	1.695	0.357	0.624	0.131	0.637	0.134
		22.7	0.357	0.075	0.226	0.046	0.156	0.034	0.077	0.015

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

Table 6. Gross findings of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Item	CTL (mg/kg)			
	Control	40	200	1000
No. of animals examined	12	12 ^a	12	12 ^b
Organ : Findings				
Kidney (right) : Dilatation of renal pelvis	0 ^c	0	0	2
Testis (right) : Atrophy	0	0	0	1
Epididymis (right) : Atrophy	0	0	0	1
Yellowish white mass	0	0	0	1

a: Includes one animal who unsucceeded in copulation and two animals whose mate had no evidence of pregnancy.

b: Includes two animals whose mate had no evidence of pregnancy.

c: Values are no. of animals with findings.

Table 7. Histopathological findings of male rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Item		Control	CTL (mg/kg)		
			40	200	1000
No. of animals examined		12	^a 12	12	^b 12
Organ : Findings	^c Grade ^d				
Forestomach : Squamous hyperplasia	+	0	0	0	2
Testis (right and/or left) : Atrophy, tubule	(Total)	1	0	0	2
	+	1	0	0	1
	+++	0	0	0	1
Epididymis (right) : Decrease, sperm, intraductal	(Total)	0	0	0	2
	+	0	0	0	1
	+++	0	0	0	1
Granuloma, spermatic	+	0	0	0	1

a: Includes one animal who unsucceeded in copulation and two animals whose mate had no evidence of pregnancy.

b: Includes two animals whose mate had no evidence of pregnancy.

c: There were no abnormal findings in limiting ridge of stomach or glandular stomach.

d: + = slight change and +++ = severe change.

e: Values are no. of animals with findings.

Table 8. General appearance of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Item	Control	CTL (mg/kg)		
		40	200	1000
Findings before gestation period				
No. of animals examined	12	12	12	12
Decrease in spontaneous activity	^a 0	0	0	1
Findings during gestation period		^b		^b
No. of animals examined	12	11	12	12
Salivation	0	0	0	1
Findings during lactation period				
No. of animals examined	12	9	12	10
All the litter died	1	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.

b: Includes two animals who had no evidence of pregnancy.

Table 9. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Group	No. of animals	Day of administration						Body weight gain	
		1	2	5	7	10	14	Day 1-14	% a
Control	12	b							
		233.9 11.4	230.6 11.3	239.0 14.1	242.3 13.4	245.4 12.6	253.6 15.3	19.667 13.480	8.491 5.781
CTL 40 mg/kg	12	227.2 10.7	231.3 11.8	236.6 12.6	245.6 14.0	247.4 15.0	252.8 17.2	25.667 9.820	11.246 4.166
		227.8 12.1	229.3 10.9	232.9 12.6	240.2 13.4	244.8 12.4	250.3 14.3	22.417 6.127	9.849 2.695
CTL 1000 mg/kg	12	231.2 12.3	230.4 11.8	235.8 13.7	239.5 16.1	244.7 15.9	252.6 18.3	21.417 9.249	9.211 3.787

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

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

Table 10. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Group	No. of animals	Day of gestation									Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	17	20	Day 0-20	% a
Control	12	b										
		260.1 14.8	266.4 15.0	280.4 15.4	289.6 18.3	298.3 18.2	310.0 20.9	331.3 21.3	357.8 23.9	403.2 29.0	143.083 16.709	54.938 4.839
CTL 40 mg/kg	9	260.0 20.4	268.9 20.9	277.3 21.1	286.6 22.0	296.4 26.3	309.8 28.7	333.4 31.0	361.7 35.4	408.8 37.6	148.778 23.140	57.217 7.554
		257.7 16.3	268.9 15.7	280.8 18.7	289.9 20.0	298.9 21.1	312.8 21.5	337.4 23.5	365.1 28.0	410.0 30.7	152.333 20.624	59.169 7.207
CTL 1000 mg/kg	10	253.4 17.2	264.3 17.0	274.3 17.3	280.7 16.3	289.5 16.9	302.0 16.6	319.8 32.4	347.0 31.4	388.9 31.7	135.500 23.230	53.562 9.406

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

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

Table 11. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Group	No. of animals	Day of Lactation			Body weight gain	
		0	1	4	Day 0-4	% a
Control	12	b		(11)c	(11)	(11)
		310.4	310.8	325.3	14.273	4.666
CTL 40 mg/kg	9	20.5	17.2	22.9	15.285	4.632
		319.4	317.0	327.0	7.556	2.510
CTL 200 mg/kg	12	29.3	29.4	28.5	13.875	4.520
		308.1	314.2	324.8	16.667	5.543
CTL 1000 mg/kg	10	28.6	25.4	27.3	10.228	3.562
		301.0	305.7	313.8	12.800	4.654
		30.6	25.2	20.6	12.717	4.779

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

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

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

Table 12. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Group	No. of animals	Day of administration					
		1	2	5	7	10	14
Control	12	^a 17.8	13.9	15.8	16.5	15.8	16.0
		2.8	2.9	2.6	2.5	2.8	3.5
CTL 40 mg/kg	12	16.0	15.0	14.9	18.8	16.5	14.4
		1.9	2.1	2.6	1.5	2.6	3.3
CTL 200 mg/kg	12	17.3	14.8	13.6	17.3	16.1	15.5
		2.8	1.9	2.3	2.7	1.7	2.2
CTL 1000 mg/kg	12	17.7	13.0	11.4**	15.1	16.8	16.1
		2.3	2.3	2.2	3.6	2.7	2.4

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

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

Table 13. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Group	No. of animals	Day of gestation							
		1	3	5	7	10	14	17	20
Control	12	a							
		16.0	20.2	19.7	20.7	20.4	19.6	20.5	19.2
		2.0	2.8	3.2	3.0	3.6	3.2	2.6	2.2
CTL 40 mg/kg	9	17.3	19.9	19.4	21.7	20.6	20.2	20.6	20.7
		2.1	1.5	2.3	3.9	2.0	2.3	2.2	2.5
CTL 200 mg/kg	12	17.8	21.6	20.7	21.3	21.5	21.3	22.0	20.2
		2.4	3.1	2.7	3.1	3.1	2.5	3.0	1.9
CTL 1000 mg/kg	10	18.5	19.1	19.5	20.1	20.5	20.4	23.0	20.1
		3.5	3.1	2.3	2.8	3.0	7.6	2.8	1.7

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

Table 14. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Group	No. of animals	Day of Lactation	
		1	4
Control	12	a	(11)b
		17.1	36.5
CTL 40 mg/kg	9	5.4	4.7
		16.8	34.2
CTL 200 mg/kg	12	3.6	3.3
		20.9	32.9
CTL 1000 mg/kg	10	5.6	4.9
		20.9	30.7*
		5.9	4.8

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

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

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

Table 15. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Group	No. of animals	Body weight g	Ovary			
			Right		Left	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Control	11	325.3 ^a	54.3	16.715	52.8	16.206
		22.9	6.8	2.043	8.8	2.336
CTL 40 mg/kg	9	327.0	57.4	17.622	51.2	15.586
		28.5	10.0	2.929	15.2	3.951
CTL 200 mg/kg	12	324.8	58.1	17.893	54.6	16.886
		27.3	11.0	3.089	9.8	3.280
CTL 1000 mg/kg	10	313.8	53.5	17.154	51.4	16.338
		20.6	7.6	2.988	12.3	3.555

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

Table 16. Gross findings of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Item	Control	CTL (mg/kg)		
		40	200	1000
No. of animals examined	a 12	b 12	12	c 12
Organ : Findings	d			
Liver : Dark red discoloration	0	0	0	1
Forestomach : Partial thickening of mucosa	0	0	0	10

a: Includes one animal killed because all the litter died.

b: Includes one animal who unsucceeded in copulation and two animals who had no evidence of pregnancy.

c: Includes two animals who had no evidence of pregnancy.

d: Values are no. of animals with findings.

Table 17. Histopathological findings of female rats dosed orally with CTL in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9619)

Item		CTL (mg/kg)			
		Control	40	200	1000
No. of animals examined		a 12	b 12	12	c 12
Organ : Findings	d e Grade				
Forestomach : Squamous hyperplasia	f (Total)	1	0	0	10
	+	1	0	0	[4]**
	++	0	0	0	[6]**
Ulcer	+	0	0	0	2
Cellular infiltration, neutrophil, lamina propria	+	0	0	0	2
Granulation, lamina propria	+	0	0	0	6
Liver : Necrosis, centrilobular	g ++	-	-	-	h 1(1)

a: Includes one animal killed because all the litter died.

b: Includes one animal who unsucceeded in copulation and two animals who had no evidence of pregnancy.

c: Includes two animals who had no evidence of pregnancy.

d: There were no abnormal findings in limiting of stomach, glandular stomach or ovary.

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

f: Values are no. of animals with findings.

g: - = blank value.

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

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

Table 18. Influence of CTL on reproductive ability in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9619)

Group	No. of pairs mated	Estrous cycle								No. of pairs with successful copulation	Days between the starting of mating and copulation	Copulation index % ^a	No. of pregnant animals	Fertility index % ^b	
		Before administration			Administration period			Normal	Abnormal						
		Normal	Abnormal		Normal	Abnormal									
			Total	Continuous diestrus		Irregular	Total		Continuous diestrus						Irregular
Control	12	12	0	- ^c	-	-	12	0	-	-	12	2.7±1.2 ^d	100.0	12	100.0
CTL 40 mg/kg	12	12	0	-	-	-	11	1	1	0	11	3.5±2.3	91.7	9	81.8
CTL 200 mg/kg	12	12	0	-	-	-	12	0	-	-	12	2.8±1.1	100.0	12	100.0
CTL 1000 mg/kg	12	12	0	-	-	-	11	1	1	0	12	3.0±2.9	100.0	10	83.3

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

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

c: - = blank value.

d: Values are means ± S.D.

Table 19. Influence of CTL on delivery and maternal behavior in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9619)

Group		No. of pregnant females	No. of corpora lutea	a				Live pups born					Dead pups born			Gestation Length day	Gestation index %	Nursing index %
				No. of implantation sites	Implan- tation index %	No. of pups born	Delivery index %	c		Sex ratio	Male	Female	No.	Male	Female			
								No.	%									
Control	Total	12	203	187		164		150			73	77	14	5	9			
	Mean		16.9	15.6	92.228	13.7	87.737	12.5	91.478	0.962	6.1	6.4	1.2	0.4	0.8	22.5	100.0	91.7
	S.D.		1.8	1.9	7.565	2.0	7.024	3.7	24.496	0.578	2.5	2.0	3.2	1.2	2.1	0.7		
CTL 40 mg/kg	Total	9	138	136		126		121			56	65	g	0	4			
	Mean		15.3	15.1	98.641*	14.0	92.887	13.4	95.727	0.919	6.2	7.2	0.6	0.0	0.4	22.4	100.0	100.0
	S.D.		2.8	2.7	2.711	2.5	6.077	3.7	8.695	0.396	2.2	2.1	1.1	0.0	1.0	0.5		
CTL 200 mg/kg	Total	12	188	182		169		169			78	91	0	0	0			
	Mean		15.7	15.2	96.781	14.1	92.495	14.1	100.000	1.038	6.5	7.6	0.0	0.0	0.0	22.5	100.0	100.0
	S.D.		2.4	2.4	4.904	2.9	8.174	2.9	0.000	0.600	2.2	3.0	0.0	0.0	0.0	0.5		
CTL 1000 mg/kg	Total	10	155	152		131		125			65	60	6	5	1			
	Mean		15.5	15.2	98.078	13.1	86.351	12.5	95.385	1.691	6.5	6.0	0.6	0.5	0.1	22.4	100.0	100.0
	S.D.		0.7	0.8	3.102	1.6	10.865	2.3	12.135	1.950	2.2	2.4	1.6	1.3	0.3	0.5		

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

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

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

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

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

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

g: Includes 1 pup of unknown sex.

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

Table 20. Gross findings of dead pups at birth in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)

Item	Male			Female		
	CTL (mg/kg)			CTL (mg/kg)		
	Control	40	200	Control	40	200
No. of animals examined	5	0	0	9	5	0
Organ : Findings					^a	
						1

a: Includes one pup of unknown sex.

b: There were no abnormal findings in all the organs and tissue.

Table 21. Influence of CTL on viability of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9619)

Item	No. of live pups born (on day 0)	Live pups on day 4			
		No.	Viability index ^a %	Male	Female
Control	150	147		73	74
	12.5	12.3	91.072	6.1	6.2
	3.7	4.2	28.753	2.5	2.4
CTL 40 mg/kg	121	120		55	65
	13.4	13.3	99.382	6.1	7.2
	3.0	2.8	1.853	2.1	2.1
CTL 200 mg/kg	169	166		77	89
	14.1	13.8	98.214	6.4	7.4
	2.9	3.0	6.186	2.1	3.1
CTL 1000 mg/kg	125	121		64	57
	12.5	12.1	96.023	6.4	5.7
	2.3	2.8	9.078	2.2	2.1

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

Table 22. General appearance of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)

Item	Male				Female			
	Control	CTL (mg/kg)			Control	CTL (mg/kg)		
		40	200	1000		40	200	1000
No. of animals examined	^a 73	56	78	65	77	65	91	60
No. of dead animals	0	1	1	1	3	0	2	3
Abnormal findings	^c -	^d 0	0	0	0	-	0	0
No. of surviving animals	73	55	77	64	74	65	89	57
Trauma and/or dark red discoloration of tail	0	0	0	0	0	2	0	0

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

b: Includes missing.

c: - = blank value.

d: Values are no. of animals with findings.

Table 23. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)

Group	No. of litters	Male					Female				
		Day of lactation			Body weight gain		Day of lactation			Body weight gain	
		0	1	4	Day 0-4	% a	0	1	4	Day 0-4	%
Control	12	(11)bc	(11)	(11)	(11)	(11)		(11)	(11)	(11)	(11)
		6.81	7.52	10.77	3.964	58.303	6.33	7.09	10.08	3.682	57.680
		0.48	0.58	0.80	0.497	6.949	0.61	0.71	0.99	0.616	9.219
CTL 40 mg/kg	9	6.62	7.50	10.88	4.256	64.131	6.34	7.07	10.32	3.978	62.443
		0.64	0.71	1.34	0.868	10.352	0.63	0.69	1.50	1.072	13.392
CTL 200 mg/kg	12	6.43	7.08	10.24	3.817	58.696	6.04	6.61	9.71	3.667	60.151
		0.82	1.11	1.87	1.157	13.137	0.80	1.13	1.81	1.166	14.506
CTL 1000 mg/kg	10	5.88**	6.31**	8.77**	2.890**	49.218**	5.34**	5.69**	7.98**	2.640*	49.387
		0.56	0.77	0.84	0.373	5.136	0.70	0.97	1.15	0.585	9.301

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

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

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

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

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

Table 24. Gross findings of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of CTL in rats (SR-9619)

Item	Male				Female			
	Control	CTL (mg/kg)			Control	CTL (mg/kg)		
		40	200	1000		40	200	1000
Findings of dead pups after birth								
No. of animals examined	0	0	1	0	2	0	2	2
a								
Organ : Findings								
Findings of pups killed on day 4 of lactation								
No. of animals examined	73	55	77	64	74	65	89	57
Organ : Findings								
b								
Kidney (left) : Dilatation of renal pelvis	0	0	1	0	0	0	0	0
Ureter (right and left) : Dilatation	0	0	2	0	0	0	0	0
Tail : Trauma	0	0	0	0	0	2	0	0
Dark red discoloration	0	0	0	0	0	2	0	0

a: There were no abnormal findings in all the organs and tissue.

b: Values are no. of animals with findings.