

最終報告書

表 題：トリメチルベンジルアンモニウム=クロリドのラットにおける簡易生殖試験

試験番号：SR08134

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙-----	1
目次-----	5
要約-----	12
緒言-----	13
材料および方法-----	13
成績-----	26
考察-----	29
参考資料-----	31

Figures

1	Body weight of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	33
2	Body weight of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	34
3	Food consumption of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	35
4	Food consumption of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	36
5	Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of Trimethylbenzylammonium Chloride in rats (SR08134) -----	37

Tables

1	General appearance of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	38
2	General appearance of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	40
3	Body weight of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	43
4	Body weight before gestation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	44
5	Body weight during gestation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	45
6	Body weight during lactation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	46
7	Food consumption of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	47
8	Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	48
9	Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	49
10	Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	50
11	Gross findings of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	51
12	Gross findings of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	52
13	Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	53
14	Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	54
15	Histopathological findings of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	55

16	Histopathological findings of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	56
17	Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	57
18	Reproduction performance of parental rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	59
19	Pregnancy and litter data of rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) -----	60
20	General appearance of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of Trimethylbenzylammonium Chloride in rats (SR08134) -----	61
21	Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of Trimethylbenzylammonium Chloride in rats (SR08134) -----	62
22	Gross findings of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of Trimethylbenzylammonium Chloride in rats (SR08134) -----	63

要 約

トリメチルベンジルアンモニウム=クロリドの0(対照、精製水)、25、50 および 100 mg/kg を1群雄雌各 12 匹の Cr1:CD(SD) ラットに、雄ラットに対しては交配開始前 14 日間およびその後の 28 日間を含む計 42 日間、雌ラットに対しては交配前 14 日間および交尾成立までの交配期間、交尾成立例は妊娠期間および哺育 3 日まで 1 日 1 回、連日経口投与して、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖に及ぼす毒性および次世代の発生・発育に及ぼす影響について検討し、以下の成績を得た。

I. 親動物について

1. 一般状態では、50 mg/kg 以上の投与群で認められた流涎および紅涙を主体とし、さらに、100 mg/kg 投与群では自発運動の低下、軟便、振戦、被毛汚れ(外尿道口周囲、口周囲あるいは眼周囲)等が認められ、雄 2 例および雌 10 例の死亡例も認められた。
2. 体重推移では、100 mg/kg 投与群の雄で投与 7 日以降、雌で妊娠期間を通して有意な低値が継続的に認められた。
3. 摂餌量では、100 mg/kg 投与群の雄で投与 2 日以降 14 日および 35 日、雌で交配前の投与 5 日から妊娠 10 日まで有意な低値が継続して認められた。
4. 器官重量では、100 mg/kg 投与群の雄で脾臓および胸腺の絶対重量の有意な低値ならびに心臓、脳、副腎、精巣および精巣上体の相対重量の有意な高値が認められ、胸腺の相対重量では有意な低値が認められ、雌では脾臓の絶対重量の有意な低値および肝臓の相対重量の有意な高値が認められた。
5. 精巣、精巣上体および卵巣の病理組織学的検査ならびに 100 mg/kg 投与群の雄について実施した精巣の精子形成に関する Stage 分類では、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

II. 雄雌動物の生殖および新生児の発生について

1. 雌の性周期異常の発現率、性周期間隔、雄雌の交尾率、雌の受胎率、黄体数、着床数、着床率、妊娠母体数、生児出産母体数、出産率、総出産児数、分娩率、哺育 0 日の生存児数、出生率、性比(死亡児も含めた哺育 0 日の全出産児、死亡例を含めない哺育 0 日の生存児ならびに哺育 4 日の生存児)、哺育 4 日の哺育率、哺育 4 日の新生児生存率のいずれにも 50 mg/kg/day まで被験物質投与に関連した変化は認められなかった。なお、例数が少ないことから 100 mg/kg 投与群を評価の対象から除外した。
2. 新生児の一般状態、体重および剖検所見にも 50 mg/kg/day まで被験物質投与に関連した変化は認められなかった。なお、100 mg/kg 投与群については評価対象としなかった。

以上のことから、本試験条件下におけるトリメチルベンジルアンモニウム=クロリドの親動物

の反復投与における無影響量(NOEL)は 25 mg/kg/day、親動物の生殖能および次世代の発生・発育に対する無影響量(NOEL)はいずれも 50 mg/kg/day と判断した。

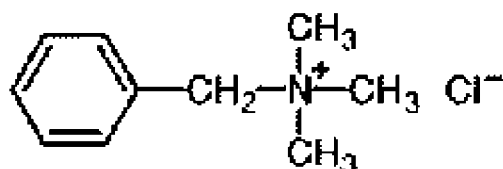
緒 言

トリメチルベンジルアンモニウム=クロリドの 0(対照、精製水)、25、50 および 100 mg/kg を 1 群雄雌各 12 匹の Cr1:CD(SD) ラットに、雄ラットに対しては交配開始前 14 日間およびその後の 28 日間を含む計 42 日間、雌ラットに対しては交配前 14 日間および交尾成立までの交配期間、交尾成立例は妊娠期間および哺育 3 日まで 1 日 1 回、連日経口投与して、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖に及ぼす毒性および次世代の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 被験物質

- 名称 : トリメチルベンジルアンモニウム=クロリド ; Trimethylbenzylammonium Chloride ¹⁾
- 別名 : ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド¹⁾ ; Benzyltrimethylammonium Chloride ^{1、3)}
塩化ベンジルトリメチルアンモニウム²⁾
- CAS No. : 56-93-9 ^{1、2、3)}
- 化審法官報公示整理番号 : (3)-2694 ^{1、2)}
- 示性式(構造式) : $[C_6H_5CH_2N(CH_3)_3]Cl^{2)}$ 、



- 分子式 : $C_{10}H_{16}ClN$ ^{1、3)}
- 分子量 : 185.70 ³⁾
- 物理化学的性質 : 外観 ; 固体¹⁾、結晶～粉末¹⁾、白色^{1、2)}、弱いアーモンド臭¹⁾、
結晶性粉末²⁾、無臭²⁾、
沸点 ; 分解²⁾

融点 ; 239°C (分解)¹⁾、238°C²⁾

水溶状 ; 澄明 (Appendix 1-1)

乾燥減量 ; 0.5% (Appendix 1-1)

蒸気圧 ; 0.3×10^{-4} Pa / 25°C¹⁾

pH ; 5.0 ~ 7.0 (50 g/L)¹⁾、6-8 (100 g/L、20°C)²⁾

LogPow ; -2.17¹⁾

溶解性 ; 易溶 水、エタノール、ブタノール¹⁾、
水 44% (20°C)²⁾、エタノールに可溶²⁾

純度 : 100.4% (非水法、Appendix 1-1)

実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し、被験物質の純度を分析し、安定であることを確認した (非水法、Appendix 1-2)。

不純物の名称およびその濃度 : 記載なし

入手量 : 500 g

安定性 : 吸湿性がある¹⁾。
通常の手扱い条件においては安定²⁾。

保存条件 : 容器は密栓して冷暗所に保管した¹⁾、²⁾ (実測範囲 1~8°C)。

保存場所 : 試験施設の検体保存室の冷蔵庫

保存期間 : 2008 年 10 月 28 日 (受入) ~ 2009 年 7 月 21 日 (産業廃棄物として回収)

取扱上の注意 : 吸湿性あり、湿気に注意する¹⁾。防湿に留意する¹⁾。火気や熱源などの着火源から遠ざける¹⁾。
手袋、マスクおよび保護メガネを着用し、クリーンベンチ内で取り扱った。

サンプリング : 被験物質サンプルとして、約 5 g を採取し、試験施設の資料保存室に保存した。

残余被験物質の処置 : 関連試験も含めすべての試験操作終了後、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

有害性情報 : 急性毒性 ラット 経口 LD_{50} 250 mg/kg¹⁾

ラット 経口 LD_{50} 300 mg/kg²⁾

マウス 経口 LD_{50} 1600 mg/kg¹⁾

経口摂取すると、悪心、嘔吐、腹痛などを起こす²⁾。

眼および皮膚を刺激する¹⁾。眼に入ると、眼が刺激される²⁾。

2. 媒体

名称 : 精製水(日本薬局方精製水)
 ロット番号 : 809070
 製造者 : ヤクハン製薬株式会社
 保存条件 : 室温
 取扱上の注意 : 特になし。

3. 投与液の調製および化学分析

(1) 投与液の調製

調製方法 : 被験物質を精秤し、所定の濃度となるように媒体を添加後、スターラーを用いて溶解させ、投与液とした。
 調製頻度 : 8 日に 1 回以上の頻度で調製し、調製後 9 日以内に投与に用いた。
 保存条件 : 冷蔵(実測範囲 2～7℃)
 保存場所 : 試験施設の検体保存室の冷蔵庫
 保存期間 : 2009 年 3 月 6 日(投与液の調製初回)～2009 年 5 月 6 日(対照群の投与液を除く最終回の払出)
 調製上の注意 : 調製の際には手袋、マスクおよび保護メガネを着用し、クリーンベンチ内で取り扱った。
 残余投与液の処置 : 残余の投与液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

(2) 投与液の化学分析

投与液の安定性 : 投与に先駆け、被験物質の 1 および 20 mg/mL の投与液について安定性に関する分析を行い、媒体中における室温保存 24 時間および冷蔵保存 9 日間の安定性を確認した(Appendix 2-1)。
 投与液の濃度確認 : 初回および最終回の投与に用いる全濃度の投与液について、被験物質の投与液中における濃度を確認した(Appendix 2-2 および 2-3)。
 濃度確認方法 : (Appendix 2-4)に示す。

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター生産の SPF Cr1:CD(SD) ラットを用いた。ラットは毒性試験等で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

雄雌各 52 匹(発注数 雄雌各 50 匹)を 2009 年 2 月 25 日に 8 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 241～276 g、雌で 190～219 g であった。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について雄雌とも馴化 13 日までの 12 日間(受入日を馴化 1 日として起算)、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を受入時(馴化 1 日)および馴化期間終了日(投与開始前々日)を含め約 1 週に 1 回の頻度で計 3 回測定した。また、雌動物について投与開始前 10 日間の性周期検査を膣垢スメア塗抹法により行った。検疫および馴化期間中に一般状態および体重推移に異常は認められなかったが、雌の性周期検査で不規則と判定された動物が 3 例認められた。

(3) 群分け

検疫および馴化期間中に実施した一般状態観察および体重測定、さらに雌については性周期検査の結果を参考にして、異常の認められない健康な動物を雄雌各 48 匹選抜して、10 週齢で試験に供した。投与開始前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるよう群分けを行った。群分け時の動物の体重範囲は、雄で 333～384 g、雌で 227～281 g であり、平均体重(雄 357.0 g、雌 250.3 g)の±20%以内であった。選抜から外れた動物は試験から除外して安楽死させた。なお、選抜された動物について投与開始前日に一般状態に異常がないことを確認した。

(4) 動物およびケージの識別

動物は、群分け前は受入時に油性フェルトペンで尾部に印を付け、群分け後は耳介に動物番号を入墨し、個体識別を行った。出生児については、個体識別を行わなかった。

飼育ケージは、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに試験番号および受入時の動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。群分け後はさらに試験群を明記し、雌動物には妊娠期間中は交尾成立日毎のグループ名および分娩予定日、哺育期間中は分娩終了日毎のグループ名も明記した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物は温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測範囲 $21 \sim 24^{\circ}\text{C}$)、湿度 $50 \pm 20\%$ (実測範囲 $33 \sim 46\%$)、換気回数 $10 \sim 15$ 回/時間、照明時間 12 時間 (8:00~20:00、人工照明) の動物飼育室 (303 号室) で飼育した。

2) 飼育器材および飼育方法

ブラケット式金属製金網床ケージ (260W×380D×180H, mm) を使用し、交尾成立雌動物については妊娠 17 日から哺育 4 日まで小型受皿と共に実験動物用床敷 (ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社) を併用した。検疫および馴化期間中は 2 匹以内、群分け後は 1 匹、交配期間中は雄雌各 1 匹、妊娠期間中は 1 匹、哺育期間中は 1 腹毎を収容した。ケージおよび給餌器は群分け時に 1 回交換し、その後は 2 週に 1 回の頻度で交換した。受皿および小型受皿は週 2 回洗浄滅菌済みのものと交換した。自動給水装置の水抜きは週 1 回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、1 日 1 回実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を 1 週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

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

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロット (081203、090106) の飼料について分析した。汚染物質の分析は Eurofins Scientific 社が、微生物検査は飼料製造業者がそれぞれ行った。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった (Appendix 3-1-1~3-2-2)。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2009 年 1 月 7 日、2009 年 4 月 1 日および 2009 年 7 月 2 日に当該飼育室と同系統配管の最末端 (301 号室) から試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社が行い、分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった (Appendix 4-1~4-3)。

(6) 試験群の構成

試験群の構成

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数(動物番号)	
			雄	雌
対照群	0	0	12 (101～112)	12 (151～162)
低用量群	25	5	12 (201～212)	12 (251～262)
中用量群	50	10	12 (301～312)	12 (351～362)
高用量群	100	20	12 (401～412)	12 (451～462)

対照群には、他の群と同様の方法で媒体のみを投与した。

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

投与量 : 0、25、50 および 100 mg/kg/day

設定理由 : 1 群につき雄雌各 5 匹の SD 系ラット[Cr1:CD(SD)]に、超純水に溶解させた被験物質の 0 (対照)、30、60 および 120 mg/kg を 28 日間反復経口投与した試験³⁾の結果、雄の 60 mg/kg 以上で流涎、雄雌の 120 mg/kg で流涎、流涙および被毛の汚れ、雌の 120 mg/kg で立毛が認められ、さらに雄の 120 mg/kg で体重増加抑制と摂餌量の低下、ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量の高値が認められ、雌の 120 mg/kg で 1 例の死亡例が認められた。このことから、簡易生殖試験では、120 mg/kg で死亡例が 1 例認められているため、高用量を 100 mg/kg とし、以下公比 2 で除した 50 および 25 mg/kg を設定した。

2) 投与

投与方法および投与経路 : ディスポーザブル胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて強制的に胃内に経口投与した。

投与回数 : 1 日 1 回、連日投与した。

投与時刻 : 9 : 00～12 : 00

ただし、分娩中の母動物は分娩終了後に投与した。

投与期間 : 雄 ; 交配開始前 14 日間およびその後の 28 日間、計 42 日間

雌 ; 交配前 14 日間および交尾成立までの交配期間、さらに妊娠期間および哺育 3 日までの期間(最長 57 日間)

投与容量 : 5 mL/kg とした。各個体の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出した。

投与方法、投与経路、投与回数および投与期間の選定理由 :

試験法ガイドラインを参考にした。

(8) 観察、測定および検査項目

I. 雄動物について

1) 一般状態観察

例数	: 全例
期間	: 投与開始日を投与 1 日として起算し、投与 1 日から投与 42 日の翌日の剖検日まで。
頻度	: 投与前(午前)および投与後(午後)の 1 日 2 回。 ただし、剖検日は午前中に 1 回。
観察方法	: 個々の動物の生死、外観、行動等について観察した。異常が認められる場合は、その症状ならびに症状の発現時刻および消失時刻を記録した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

2) 体重測定

例数	: 全例
測定日	: 投与開始日を投与 1 日と起算し、投与 1、2、5、7、10、14、その後は 7 日毎の投与前、投与終了日および剖検日に測定した。 死亡例については、死亡発見時の体重も記録した。
測定方法	: 電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定し、1 g 単位で記録した。

体重増加量および体重増加率：以下の式により算出した。

$$\begin{aligned}\text{体重増加量} &= (\text{投与 42 日体重}) - (\text{投与 1 日体重}) \\ \text{体重増加率} &= \frac{\text{体重増加量}}{\text{投与 1 日体重}} \times 100\end{aligned}$$

3) 摂餌量測定

例数	: 全例
測定日	: 交配期間および剖検日を除き、体重測定と同じ日に測定した。
測定方法	: 電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定し、1 g 単位で記録した。投与開始前日に適当量を測定してケージ毎に給与し、その後は測定日に残量および給与量を測定した。 ただし、剖検前日は残量のみを測定した。
摂餌量の算出	: 以下の式により算出する。

$$\text{摂餌量(g/day)} = \frac{\text{給与量(g)} - \text{残量(g)}}{\text{測定日間の日数}}$$

4) 剖検

例数 : 全例

検査時期 : 死亡例は発見後速やかに、生存例については投与 42 日の翌日に実施した。

検査方法 : 体外表を観察した後、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、以下の器官・組織を 10% 中性緩衝ホルマリンに固定・保存した。なお、左右の精巣および精巣上体はブアン液で固定、70% エタノールに保存した。

固定・保存する器官または組織 :

左右の精巣および精巣上体ならびに肉眼的異常部位[大脳(No. 104)および回腸(No. 203) ; 正常組織との境界部を含む]

5) 器官重量測定

例数・時期 : 剖検時に全例について実施した。

測定方法 : 以下の器官・組織について、電子式上皿天秤(ER-180A、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定および記録した。対の器官は左右併せて測定した。

検査器官 : 脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、精巣、精巣上体

相対重量の算出 : 以下の式により算出した。

$$\text{相対重量} = \frac{\text{絶対重量}}{\text{剖検口体重}} \times 100$$

6) 病理組織学的検査

例数 : 全例について以下の器官・組織の標本を作製し、対照群および高用量群の全例について鏡検した。

鏡検の結果、被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかったため、その他の投与群については鏡検を行わなかった。

なお、剖検時の肉眼的異常部位についても鏡検した。

検査方法 : パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。

器官・組織名 : 左右の精巣および精巣上体(精子形成の Stage 分類を含む)

Ⅱ．雌動物について

1) 一般状態観察

例数 : 全例
 期間 : 投与開始日から剖検日まで
 頻度 : (1) 雄動物と同じ
 観察方法 : (1) 雄動物と同じ

2) 体重測定

例数 : 全例
 測定日 : 投与開始日を投与 1 日、交尾成立日を妊娠 0 日、分娩終了日を哺育 0 日と起算し、以下の日に測定した。
 投与 1、2、5、7、10、14 日の投与前、
 妊娠 0、1、3、5、7、10、14、17 および 20 日の投与前、
 哺育 0 および 1 日の投与前、ならびに哺育 4 日の剖検日
 ただし、分娩遅延例は妊娠 26 日(剖検日)、
 交配期間中は投与液量算出のため、相手雄の測定日と同じ日に測定した。
 死亡例については、死亡発見時または屠殺日の体重も記録した。
 測定方法 : (1) 雄動物と同じ
 体重増加量および体重増加率 : 以下の式により算出した。

交配前投与期間

$$\text{体重増加量} = (\text{投与 14 日体重}) - (\text{投与 1 日体重})$$

$$\text{体重増加率} = \frac{\text{体重増加量}}{\text{投与 1 日体重}} \times 100$$

妊娠期間

$$\text{体重増加量} = (\text{妊娠 20 日体重}) - (\text{妊娠 0 日体重})$$

$$\text{体重増加率} = \frac{\text{体重増加量}}{\text{妊娠 0 日体重}} \times 100$$

哺育期間

$$\text{体重増加量} = (\text{哺育 4 日体重}) - (\text{哺育 0 日体重})$$

$$\text{体重増加率} = \frac{\text{体重増加量}}{\text{哺育 0 日体重}} \times 100$$

3) 摂餌量測定

例数 : 全例
 測定日 : 交配期間を除き、(2)、2) 体重測定の測定日と同じ。ただし、妊娠 0 日および哺育 0 日は給餌量のみ。
 測定方法 : (1) 雄動物と同じ

4) 剖検

例数 : 全例

検査時期 : 哺育 4 日

ただし、死亡例は発見後速やかに、妊娠 25 日まで分娩が認められない交尾成立例は妊娠 26 日の朝に、また異常出産例は発見後速やかに実施した。

検査方法 : (1)雄動物と同様に剖検し、以下の器官・組織を 10%中性緩衝ホルマリンに固定・保存した。対の器官は左右とも保存した。

固定・保存する器官または組織 :

左右の卵巢ならびに肉眼的異常部位[子宮および膣 (No. 154) ; 正常組織との境界部を含む]

5) 器官重量測定

例数・時期 : 剖検時に全例について実施した。

哺育 4 日に剖検した母動物について統計学的方法を適用した。対の器官は左右併せて測定した。

測定方法 : (1)雄動物と同じ

検査器官 : 脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、卵巢

相対重量の算出 : (1)雄動物と同じ

6) 病理組織学的検査

例数 : (1)雄動物と同じ

検査方法 : (1)雄動物と同じ

器官・組織名 : 左右の卵巢

III. 雄雌動物の生殖および新生児の発生について

1) 性周期検査

例数 : 雌の全例

期間 : 投与開始日から交尾成立日まで。

方法 : ギムザ染色による膣垢塗抹標本作製し、光学顕微鏡下で性周期段階を判定した。

判定 : 性周期の各段階(発情前期、発情期、発情後期および発情休止期)を 4 日から 6 日の間隔で 2 回以上繰り返すものを正常とし、性周期間隔を算出した。各段階の一部がみられない場合や同一の性周期段階が 3 日を超え継続してみられる場合を不規則、発情休止期が 7 日以上継続してみられるものを連続非発情とし、いずれも異常と判定した。

2) 生殖能検査

例数 : 雄雌の全例

時期 : 投与14日より最長14日間(交配開始日の翌日を交配1日とする)。
 ただし、交配相手の雄が死亡等によりいない場合は、既に交配が成立している同試験群内の雄を選抜して交配させた。
 なお、交配期間14日間に交尾が認められなかった雌について、既に交尾が確認されている雄動物を用いて再交配期間を設定した。

交配組合せ : 原則として、同一群の動物番号末尾が同一動物を1対とした。

方法 : 同試験群内の雄雌1対を交配開始日の夕刻より交尾が確認されるまで連続同居させた。

交尾成立の確認方法 : 膈内または受皿上に落下した膈栓、あるいは膈垢スミア標本中の精子により確認した。なお、いずれかが認められた日を妊娠0日とした。
 次式から群毎に交尾率を算出した。

$$\text{交尾率(Copulation index、\%)} = \frac{\text{交尾した雄雌対の数}}{\text{同居させた雄雌対の数}} \times 100$$

受胎能 : 妊娠の確認を分娩の有無および剖検時に子宮内の着床痕の計数により行った。
 次式から群毎に受胎率を算出した。

$$\text{受胎率(Fertility index、\%)} = \frac{\text{受胎した雌数}}{\text{交尾した雄雌対の数}} \times 100$$

3) 分娩および哺育状態観察

例数 : 受胎した雌の全例

分娩観察 : 交尾が確認された雌動物は全例自然分娩させた。
 分娩状態を妊娠21日から25日の朝まで、毎日3回(9:00、13:00および17:00)観察した。

分娩終了の確認 : 9:00に母動物が児を巣の中に集めて腹の下に抱え込んでいるのが観察された場合に分娩終了とし、その日を哺育0日とした。
 1匹以上の生存児を出産したものを正常出産とした。
 分娩終了の確認ができない場合は異常出産とした。
 次式から群毎に出産率を算出した。

$$\text{出産率(Gestation index、\%)} = \frac{\text{生児出産雌数}}{\text{妊娠雌数}} \times 100$$

出産児の観察 : 哺育0日に正常に出産した腹毎に生存児数と死亡児数とを計数し、それらの合計を出産児数とした。

次式から腹毎に出生率を算出した。

$$\text{出生率(Live birth index、\%)} = \frac{\text{出産時生児数}}{\text{出産児数}} \times 100$$

出産児の性比の算出 : 哺育0日に個々の児動物の性を肛門と生殖突起の間の長さで判定した。

次式から腹毎に性比を算出した。

死亡児も含めた哺育0日の全出産児、死亡例を含めない哺育0日の生存児ならびに哺育4日の生存児を対象として以下を算出した。

$$\text{哺育0日の全出産児の性比(Sex ratio)} = \frac{\text{雄出産児数}}{\text{雄出産児数} + \text{雌出産児数}}$$

$$\text{哺育0日の生存児の性比(Sex ratio)} = \frac{\text{雄生存児数}}{\text{雄生存児数} + \text{雌生存児数}}$$

$$\text{哺育4日の生存児の性比(Sex ratio)} = \frac{\text{雄生存児数}}{\text{雄生存児数} + \text{雌生存児数}}$$

妊娠期間の算出 : 交尾を認めた日から分娩終了までの期間の日数を計数した。

分娩率の算出 : 剖検時に各雌の子宮内の着床痕を肉眼的に計数した。

次式から腹毎に分娩率を算出した。

$$\text{分娩率(Delivery index、\%)} = \frac{\text{出産児数}}{\text{着床痕数}} \times 100$$

着床率の算出 : 剖検時に各雌の卵巢の妊娠黄体数を計数した。

次式から腹毎に着床率を算出した。

$$\text{着床率(Implantation index、\%)} = \frac{\text{着床痕数}}{\text{妊娠黄体数}} \times 100$$

哺育4日の哺育率の算出 : 次式から群毎に算出した。

$$\text{哺育率(Nursing index、\%)} = \frac{\text{哺育4日に哺育児を持つ雌数}}{\text{生児出産雌数}} \times 100$$

4) 新生児の一般状態観察

例数 : 全例

頻度 : 1回/日

期間 : 哺育日数は分娩終了日を哺育0日と起算して、分娩終了日から哺育4日までとした。

観察方法 : 生存または死亡の確認、一般状態および外表について観察した。

なお、死亡例は剖検し、Whole body を10%中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。

新生児生存率の算出 : 哺育 4 日の新生児生存率を次式から算出した。

$$\text{新生児生存率 (Viability index、\%)} = \frac{\text{哺育 4 日の生存児数}}{\text{出産時生児数}} \times 100$$

死亡児の処置 : 死亡児は発見後速やかに剖検した。

これらの例は Whole body を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。

5) 新生児の体重測定

例数・時期 : 生児全例について、哺育 0、1 および 4 日に実施した。

測定方法 : 電子式上皿天秤 (GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ) を用いて腹毎に測定し、0.1 g まで記録した。
雄雌別の合計体重について 1 腹を標本単位として平均体重を算出し、統計学的方法を適用した。

6) 新生児の剖検

時期・例数 : 哺育 4 日に全例について実施した。

検査方法 : 体外表 (口腔内を含む) を観察し、二酸化炭素吸入法により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。異常例については、Whole body を 10% 中性緩衝ホルマリンに固定・保存した。

5. 統計学的方法

体重、体重増加量および増加率、摂餌量、器官の絶対重量および相対重量、精子形成の Stage 分類、性周期間隔、妊娠黄体数、着床痕数および着床率、出産児数、出産時の生存児数および死亡児数、分娩率、出生率、性比、妊娠期間、哺育 4 日の生存児数および新生児生存率の成績について群毎の平均値および標準偏差を算出し、項目毎に Bartlett の検定法を行い、等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合は Dunnett の検定法を用いて対照との比較を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照との比較を行った。

病理組織学的検査については、2 段階以上のグレードが認められた所見がなかったため、有意差検定は行わなかった。

性周期異常の発現率、交尾率、受胎率、出産率および哺育 4 日の哺育率について、多試料 X^2 検定を行い、その結果有意差が認められた場合には 2 試料 X^2 検定で対照との比較を行った。ただし、2 試料 X^2 検定に不適合の場合には Fisher の直接確率検定法を用いた。

対照との比較検定については、有意水準は 5% とした。なお、統計学的方法に関する表示方法を INDIVIDUAL DATA の冒頭に示す。

なお、高用量群の雌では、新生児を分娩した例数が 1 匹であることから、哺育期間に関し

ては対照との比較検定を実施しなかった。

成 績

I. 親動物について

1. 一般状態

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

雄：対照群および低用量(25 mg/kg、以下省略)群では、投与期間中に異常は認められなかった。

中用量(50 mg/kg、以下省略)群では、投与 32 日以降に流涎が散見された以外に異常は認められなかった。

高用量(100 mg/kg、以下省略)群では、投与 6 日以降に流涎、紅涙、被毛汚れ(外尿道口周囲、口周囲あるいは眼周囲)、自発運動の低下、軟便および振戦が認められ、投与 6 および 28 日に各 1 例の死亡例が認められた。

雌：対照群および低用量群では、投与期間中(交配前期間、交配期間、妊娠期間および哺育期間)に異常は認められなかった。

中用量群では、交配前期間および交配期間には異常は認められなかった。妊娠期間では、妊娠 20 日以降に流涎および紅涙が認められ、妊娠 23 日に 1 例が分娩途中で死亡し眼周囲の被毛汚れも認められた。哺育期間には異常は認められなかった。

高用量群では、交配前期間の投与 6 日以降に流涎、紅涙、振戦、被毛汚れ(外尿道口周囲、口周囲あるいは眼周囲)、自発運動の低下が認められ、投与 8 日には 1 例が呼吸緩徐および横臥を示し死亡した。また、投与 13 日にも呼吸緩徐および横臥等を示し 2 例が死亡した。妊娠期間にも、流涎および紅涙等が継続して認められ、妊娠 18 日に 1 例、妊娠 20 日に 4 例、妊娠 21 日に 2 例がいずれも分娩開始前に死亡した。

生存した 2 例中 1 例は妊娠 22 日に雄雌各 3 例を出産し、哺育 0～2 日まではいずり姿勢を示したが、哺育 4 日まで哺育行動等に異常は認められなかった。他の 1 例は妊娠 26 日まで分娩せず、剖検により不妊であることが確認された。

2. 体重推移

体重測定の結果を Figure 1 および 2、Table 3～6、INDIVIDUAL DATA 2-1-1～2-4-4 に示す。

雄：低および中用量群では、有意な変化は認められなかった。

高用量群では、投与 5 日から低値傾向がみられ、投与 7 日以降投与終了時(剖検時含む)まで有意な低値が継続的に認められた。また、投与期間中の体重増加量および増加率で

は、対照群の 50～55%の低値であり統計学的な有意差が認められた。

雌：低および中用量群では、交配前、妊娠期間および哺育期間ともに有意な変化は認められなかった。

高用量群では、交配前期間の投与 5 日から低値傾向がみられ、体重増加量および増加率では対照群の 50%未満の低値であったが統計学的な有意差は認められなかった。

妊娠期間では、期間を通して有意な低値が継続的に認められた。一方、体重増加量および増加率では対照群の 86～95%の低値であったが統計学的な有意差は認められなかった。

3. 摂餌量

摂餌量測定の結果を Figure 3 および 4、Table 7～10、INDIVIDUAL DATA 3-1-1～3-4-4 に示す。

雄：低用量群では、有意な変化は認められなかった。

中用量群では、投与 2 日にのみ有意な低値が認められた。

高用量群では、投与 2～14 日および 35 日に有意な低値が認められた。

雌：低および中用量群では、有意な変化は認められなかった。

高用量群では、交配前期間の投与 5～14 日に有意な低値が認められた。

妊娠期間では、妊娠 3～10 日に有意な低値が認められた。

4. 剖検所見

剖検の結果を Table 11 および 12、INDIVIDUAL DATA 4-1-1～4-2-4 に示す。

雄：対照群では、脳室拡張が 1 例に認められた。

低用量群では、回腸の憩室、精巣および精巣上体の萎縮ならびに精巣上体の尾部黄白色斑が各 1 例に認められた。

中用量群では、異常所見は認められなかった。

高用量群では、精巣上体の尾部黄白色腫瘍が 1 例に認められた。

雌：対照群では、子宮の内腔拡張および膣閉鎖が 1 例に認められた。

低、中および高用量群では、異常所見は認められなかった。

5. 器官重量

器官重量測定の結果を Table 13 および 14、INDIVIDUAL DATA 5-1-1～5-2-8 に示す。

雄：低および中用量群では、有意な変化は認められなかった。

高用量群では、脾臓および胸腺の絶対重量の有意な低値ならびに腎臓、心臓、脳、副腎、精巣および精巣上体の相対重量の有意な高値が認められ、胸腺の相対重量では有意な低値が認められた。

雌：低用量群では、心臓の相対重量の有意な高値が認められた。

中用量群では、脾臓の絶対重量の有意な低値および肝臓の相対重量の有意な高値が認められた。

6. 病理組織学的検査

病理組織学的所見を Table 15 および 16、INDIVIDUAL DATA 6-1-1～6-2-2 に示す。

雄：対照群では、軽度な脳室拡張が 1 例に認められた。

低用量群では、1 例に精巣の精細管の重度な萎縮および軽度な間細胞過形成ならびに精巣上体の重度な精子減少および軽度な管腔内細胞残屑が認められ、また、軽度な精子肉芽腫ならびに回腸の軽度な憩室が各 1 例に認められた。

高用量群では、精巣上体の軽度な精子肉芽腫が 1 例に認められた。

雌：対照群では、子宮の軽度な内腔拡張、膣の軽度な閉鎖および軽度な粘膜固有層の炎症性細胞浸潤が 1 例に認められた。

高用量群では、異常所見は認められなかった。

7. 精巣の精子形成

精巣の精子形成に関する Stage 分類を Table 17、INDIVIDUAL DATA 7-1～7-8 に示す。

精細管単位あたりでは、Stage VII-VIII のプレプロトテ期精母細胞数、パキテ期精母細胞数および精子細胞数(round)、Stage IX-XI の精粗細胞数、レプトテ期精母細胞数およびパキテ期精母細胞数、Stage XII-XIV の精粗細胞、ザイゴテ期/パキテ期精母細胞数およびパキテ期/ディプロテ期精母細胞数にそれぞれ高用量群で有意な高値が認められた。また、セルトリ細胞単位あたりでは、Stage VII-VIII のプレプロトテ期精母細胞数および精子細胞数(round)、Stage IX-XI の精粗細胞数ならびに Stage XII-XIV のザイゴテ期/パキテ期精母細胞数にそれぞれ高用量群で有意な高値が認められた。

II. 雄雌動物の生殖および新生児の発生について

1. 性周期

性周期検査の成績を Table 18、INDIVIDUAL DATA 8-1～8-4 に示す。

対照群の 2 例、中および高用量群の各 1 例に連続非発情と判定された例が認められたが、性周期異常の発現率および性周期間隔には、各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

2. 生殖能

生殖能検査の成績を Table 18、INDIVIDUAL DATA 9-1～9-4 に示す。

交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間、哺育率のいずれにも低および中用量群に対照群と比較して有意な差は認められなかった。

高用量群の性周期の異常の発現率、性周期間隔、交尾率、受胎率に有意な差は認められな

った。

3. 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態の成績を Table 19、INDIVIDUAL DATA 10-1～10-4 に示す。

黄体数、着床痕数、着床率、分娩率、出産児数、哺育 0 日の生存児数と性比および出生率、哺育 4 日の新生児生存率および性比のいずれにも低および中用量群に对照群と比較して有意な差は認められなかった。

高用量群では、黄体数、着床痕数、着床率に有意な差は認められなかったが、分娩終了まで生存した例は 1 例のみであり、総出産児数は 6 匹と他群より少ない出産児数であった。しかし、新生児に異常はなく哺育 4 日まで全例生存し体重増加も順調であった。

4. 新生児の一般状態

新生児の一般状態観察の成績を Table 20、INDIVIDUAL DATA 11-1～11-4 に示す。

哺育 0 日から 4 日の間に死亡例が对照群で雄 3 例および雌 2 例、低用量群で雄 2 例および雌 1 例、中用量群で雄 1 例および雌 2 例が認められたが、高用量群には死亡例は認められなかった。

哺育 4 日の生存例には低および中用量群に異常は認められなかった。

5. 新生児の体重

新生児の体重測定の結果を Table 21、INDIVIDUAL DATA 12-1～12-4 に示す。

低および中用量群に有意な差は認められなかった。

高用量群では、雄雌とも順調な体重増加が認められた。

6. 新生児の剖検所見

新生児の剖検の結果を Table 22、INDIVIDUAL DATA 13～14-4 に示す。

哺育 0 日から 4 日の間の死亡例では、異常所見は認められなかった。

哺育 4 日の生存例では、对照群の雌 1 例に腎臓の腎盂拡張ならびに低用量群の雌 1 例に腎臓の腎盂拡張、尿管拡張および膀胱拡張が認められた。中および高用量群では異常所見は認められなかった。

考 察

トリメチルベンジルアンモニウム=クロリドの 0(对照、精製水)、25、50 および 100 mg/kg を 1

群雄雌各 12 匹の Cr1:CD(SD) ラットに、雄ラットに対しては交配開始前 14 日間およびその後の 28 日間を含む計 42 日間、雌ラットに対しては交配前 14 日間および交尾成立までの交配期間、交尾成立例は妊娠期間および哺育 3 日まで 1 日 1 回、連日経口投与して、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖に及ぼす毒性および次世代の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

I. 親動物について

一般状態では、高用量で投与 6 および 28 日に雄各 1 例、投与 8 および 13 日に雌 1 および 2 例が死亡した。毒性徴候としては、流涎および紅涙を主体とし、流涎については中用量以上の雄雌、紅涙については中用量以上の雌で認められた。高用量では自発運動の低下、軟便、振戦、被毛汚れ(外尿道口周囲、口周囲あるいは眼周囲)等が雄雌で認められ、摂餌量の低下および体重減少を伴った。用量設定根拠とした 28 日間反復経口投与毒性試験³⁾では、投与 4 週に雌 1 例の死亡が報告されているが、本試験における死亡例は、1～2 週間程度の投与期間からの発現であり、単に体重減少等による衰弱死とは考え難く、自発運動の低下や振戦が認められていることから被験物質投与に関連した何らかの中樞作用による死亡と推察される。一方、妊娠雌では、妊娠 18～21 日に 7 例の死亡例が認められた。妊娠末期には、母動物の体重が急勾配で増加することから、被験物質の投与量も増加し、このことに起因した過剰な投与量が一因である可能性が考えられる。また、ほとんどの死亡例が妊娠 20 あるいは 21 日に集約的に発現し中用量の 1 例は分娩途中の死亡であることから、これらの例では分娩期のストレスあるいは体力的消耗なども関与した可能性が考えられる。

体重推移では、雄は投与 7 日以降、雌は妊娠期間を通して有意な低値が継続的に認められ、摂餌量では、雄は投与 2 日以降 14 日および 35 日、雌は交配前の投与 5 日から妊娠 10 日まで有意な低値が継続して認められた。これらの有意差が認められている期間の前後にも低値傾向がみとめられ被験物質投与に関連した変化と考えられた。

剖検所見では、脳室拡張、回腸の憩室、精巣および精巣上体の萎縮ならびに精巣上体の尾部黄白色斑、精巣上体の尾部黄白色腫瘍、子宮の内腔拡張および膣閉鎖が各 1 例に認められたが、いずれも用量依存的な変化ではなく被験物質投与との関連性はないと推察された。

器官重量では、高用量群の雄で脾臓および胸腺の絶対重量の有意な低値ならびに心臓、脳、副腎、精巣および精巣上体の相対重量の有意な高値が認められ、胸腺の相対重量では有意な低値が認められ、雌では脾臓の絶対重量の有意な低値および肝臓の相対重量の有意な高値が認められた。これらの有意差は、剖検時の体重に有意な低値あるいは低値傾向が認められているにも関わらず、いずれも低下あるいは増加を示していることから、被験物質投与に関連した変化と推察された。一方、高用量群の雄で認められている腎臓の相対重量の有意な増加については、絶対重量は低下していることから、見かけ上の有意差と考えられ、毒性学的な意義はないと推察された。

精巣、精巣上体および卵巣の病理組織学的検査では、剖検所見で肉眼的異常が確認された例に精巣の精細管の重度な萎縮や軽度な精子肉芽腫が認められているが、他の例には異常所見はなく、

被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

高用量群の雄について実施した精巣の精子形成に関する Stage 分類では、精細管単位あたりおよびセルトリ細胞単位あたりの精母細胞数、精子細胞数あるいは精粗細胞数に Stage I-VI を除く各 Stage に対照群と比較して有意な高値が認められたが、これらの変化はセルトリ細胞数には変化がないこと、低値ではなく高値であることから、毒性学的な意義はないと判断した。

以上のように、被験物質投与に関連した変化として、50 mg/kg 投与群で雄雌に流涎、雌に紅涙および眼周囲の被毛汚れならびに死亡例が認められた。

100 mg/kg 投与群では、雄雌に流涎、紅涙、振戦等、体重低下あるいは増加抑制、摂餌量の低下、雄に胸腺重量の低値ならびに死亡例が認められた。

II. 雄雌動物の生殖および新生児の発生について

親動物の生殖能については、雌の性周期異常の発現率、性周期間隔、雄雌の交尾率、雌の受胎率、黄体数、着床数、着床率、妊娠母体数では 100 mg/kg/day まで被験物質投与に関連した変化は認められなかった。また、生児出産母体数、出産率、総出産児数、分娩率、哺育 0 日の生存児数、出生率、性比(死亡児も含めた哺育 0 日の全出産児、死亡例を含めない哺育 0 日の生存児ならびに哺育 4 日の生存児)、哺育 4 日の哺育率、哺育 4 日の新生児生存率については 50 mg/kg/day まで被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

次世代の発生・発育については、100 mg/kg 投与群については 1 腹のみであり、評価の対象とできないことから、50 mg/kg/day まで新生児の一般状態、体重および剖検所見で被験物質投与に関連した変化は認められなかったと判断した。

したがって、本試験条件下におけるトリメチルベンジルアンモニウム=クロリドの親動物の反復投与における無影響量(NOEL)は 25 mg/kg/day、親動物の生殖能および次世代の発生・発育に対する無影響量(NOEL)はいずれも 50 mg/kg/day と判断した。

参考資料

- 1) 製品安全データシート. 東京化成工業株式会社.
- 2) 製品安全データシート. 関東化学株式会社.
- 3) ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド. 英文要旨および 28 日間反復経口投与毒性試験. 既存化学物質毒性データベース(国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室).

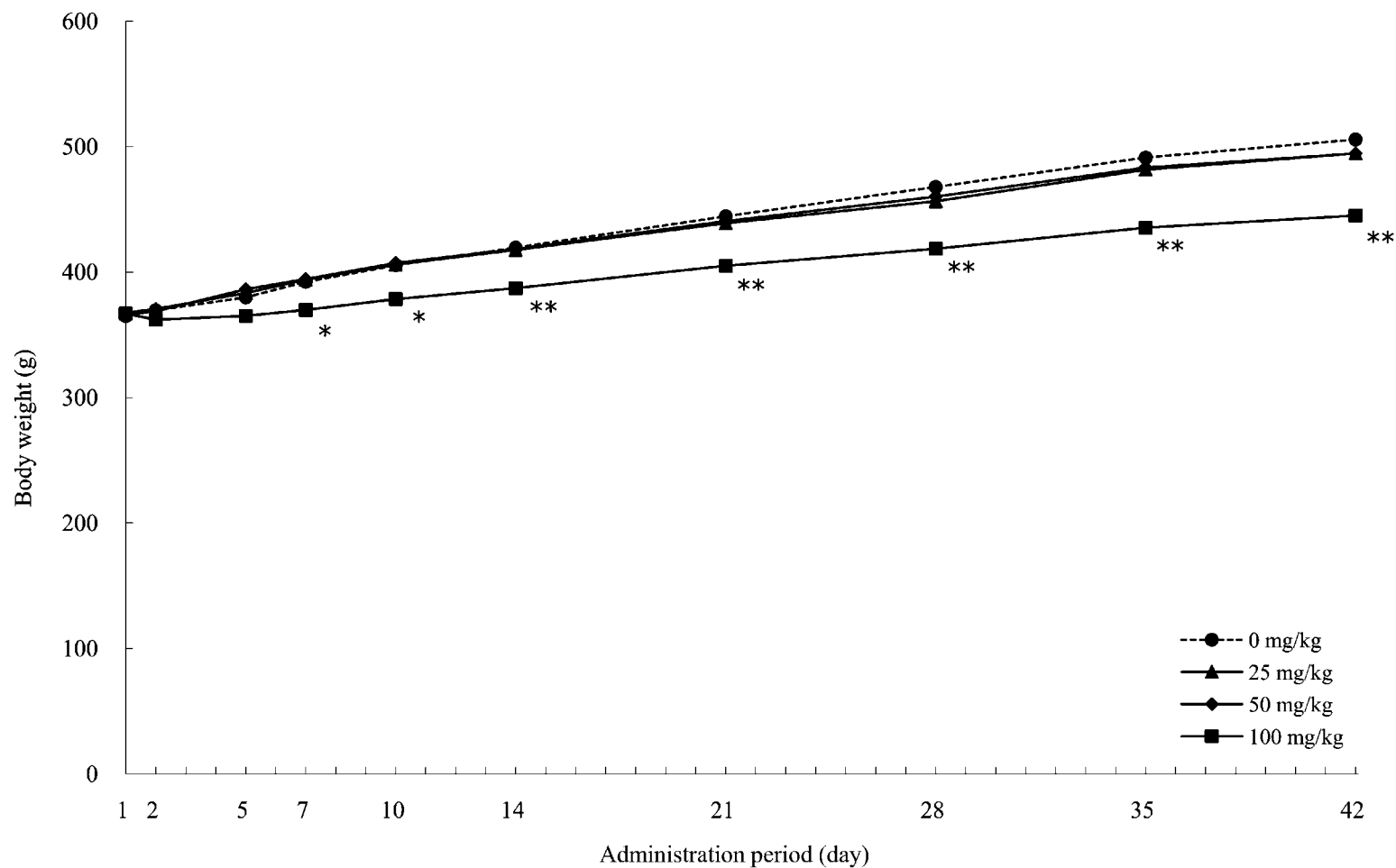


Figure 1 Body weight of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

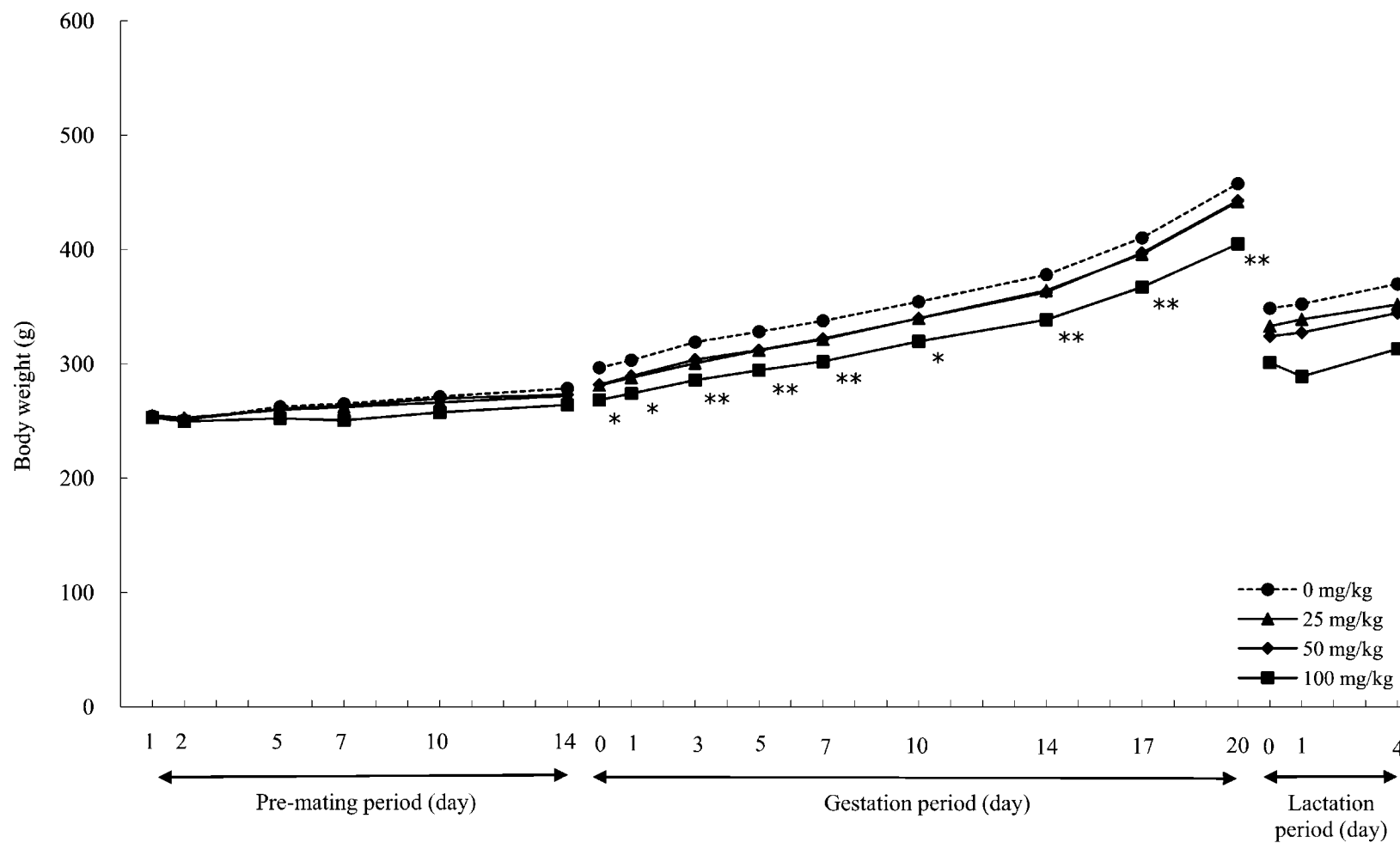


Figure 2 Body weight of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

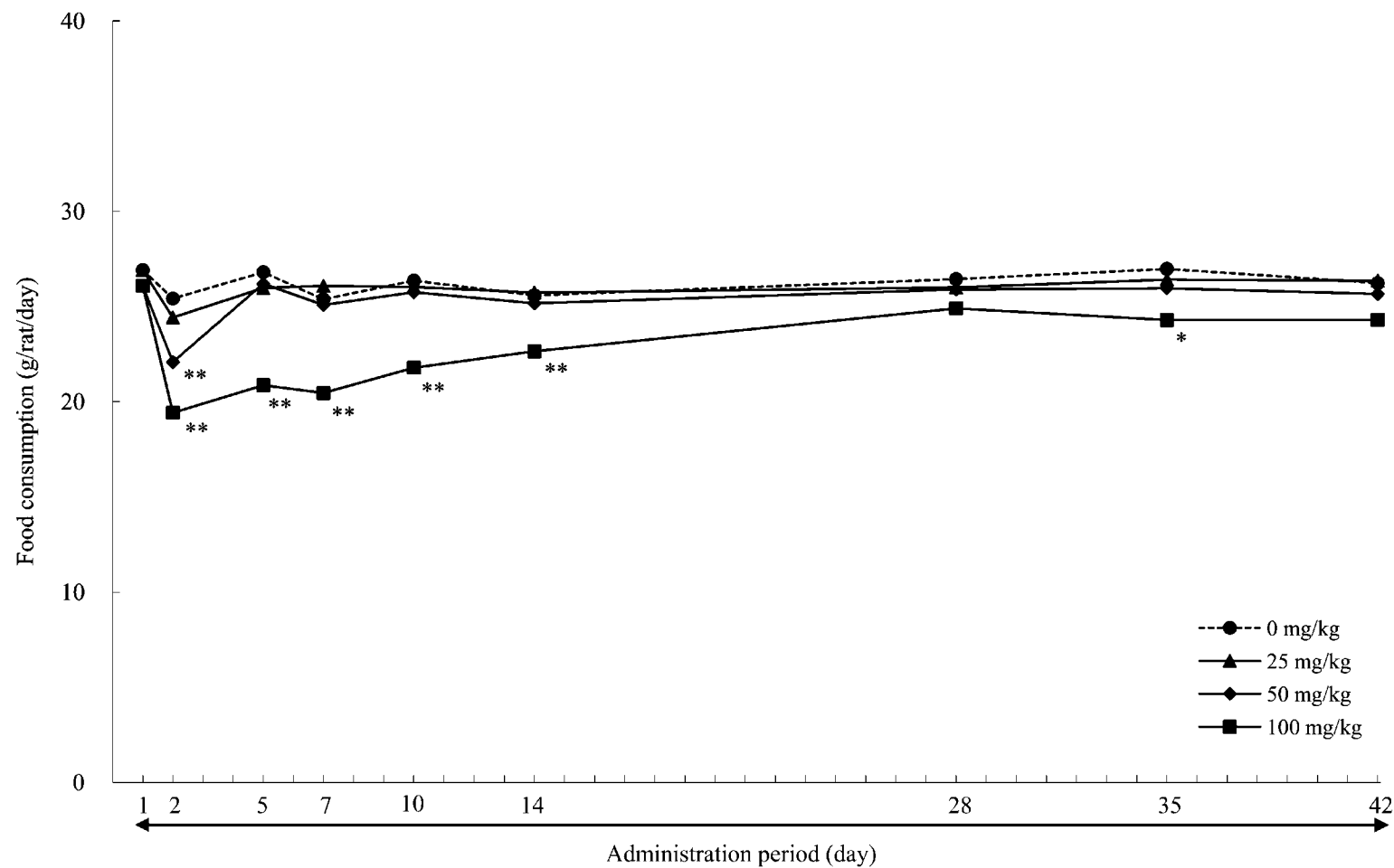


Figure 3 Food consumption of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

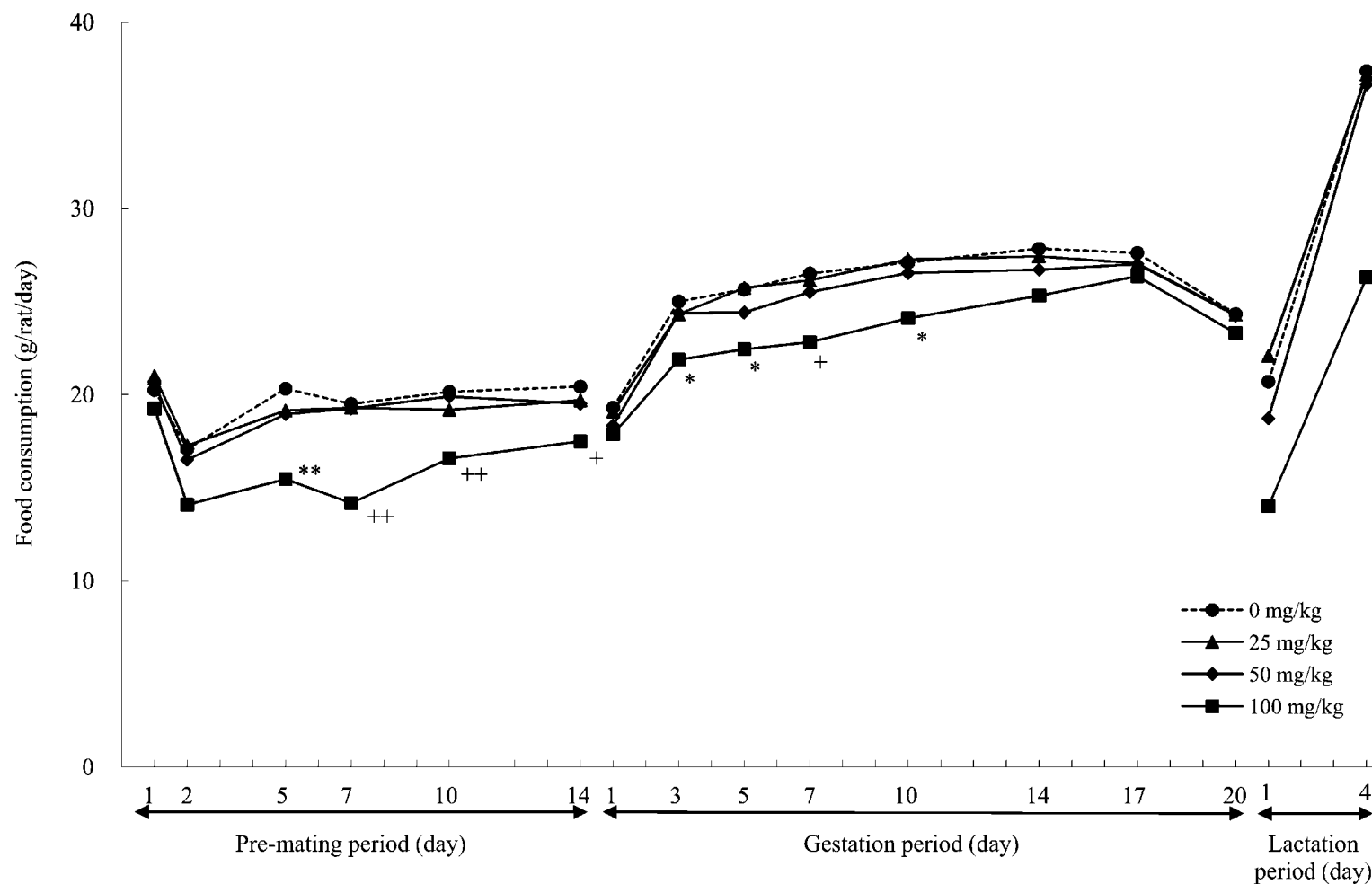


Figure 4 Food consumption of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

+ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

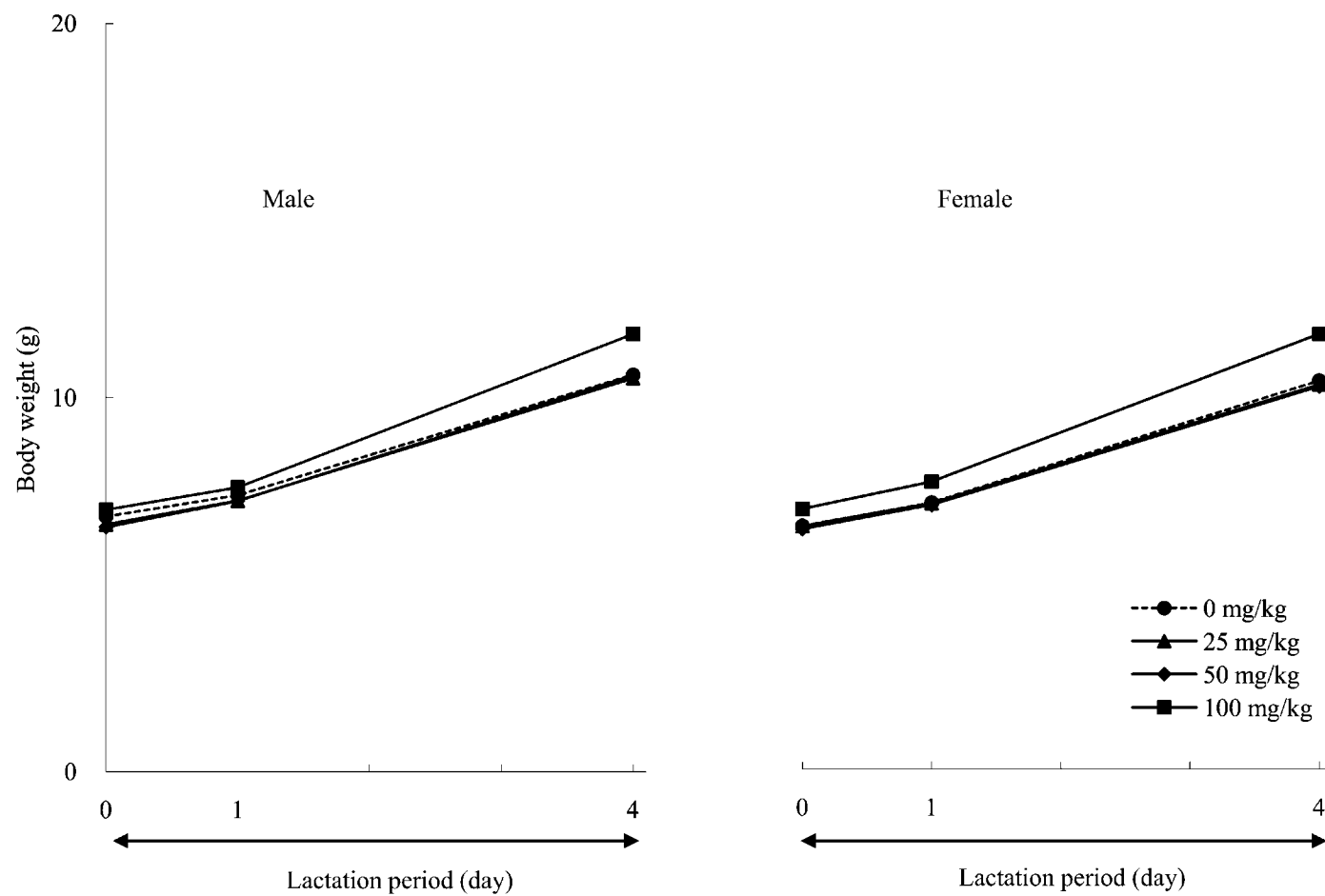


Figure 5 Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of Trimethylbenzylammonium Chloride in rats (SR08134)

Table 1 General appearance of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group	Findings	Administration period (day)																			
		1-5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
25 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
50 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of animals examined	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	No abnormal findings	12	8	7	4	5	4	6	5	5	4	5	5	3	4	5	5	5	6	7	5
	Decrease in locomotor activity	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Reddish tear	0	1	0	0	3	3	3	0	3	5	3	2	3	4	4	5	4	4	3	1
	Salivation	0	2	3	6	5	6	4	5	6	6	5	4	6	5	5	4	5	4	4	5
	Soft feces	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0
	Soil of perigenital fur	0	2	1	1	1	1	1	3	0	1	1	1	1	2	2	2	1	0	0	2
	Soil of periocular fur	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Soil of perioral fur	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	2
	Dead	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Values are number of animals with findings.

(to be continued)

Table 1 General appearance of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) (continued)

Group	Findings	Administration period (day)																		Autopsy day
		25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
25 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
50 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	11	11	11	12	12	12	10	11	12	12	11	12
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	1	0	0	1	0
100 mg/kg	Number of animals examined	11	11	11	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	No abnormal findings	1	5	5	3	4	4	4	3	2	2	3	2	4	2	2	3	3	3	10
	Reddish tear	3	3	5	3	3	4	4	4	4	4	6	6	4	5	6	5	4	4	0
	Salivation	10	5	5	7	6	5	6	6	8	7	7	8	5	7	7	7	7	6	0
	Soft feces	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	Soil of perigenital fur	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	Soil of periocular fur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Soil of perioral fur	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tremor	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	Dead	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Values are number of animals with findings.

Table 2 General appearance of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group	Findings	Pre-mating period (day)																									
		1-5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21,22	23	24	25	26	27-29	30,31			
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	8	6	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	8	6	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
25 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	5	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	5	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
50 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	6	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	11	11	11	11	11	9	9	6	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
	No abnormal findings	12	4	5	5	3	3	3	4	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
	Bradypnea	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
	Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
	Lateral position	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
	Reddish tear	0	6	5	4	8	8	7	4	6	6	6	6	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-		
	Salivation	0	7	6	7	7	7	8	6	7	5	6	6	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	-		
	Soil of perigenital fur	0	0	0	3	1	1	4	6	5	3	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-	-		
	Soil of periocular fur	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
	Soil of perioral fur	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
	Tremor	0	2	3	1	0	3	5	2	3	3	0	3	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-		
	Dead	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-		

Values are number of animal with findings.

- : Blank.

(to be continued)

Table 2 General appearance of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) (continued-1)

Group	Findings	Gestation period (day)																									
		0	1	2	3	4	5,6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24,25	26	
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	2	2	2	
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	2	2	2	
25 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	1	1	1	
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	1	1	1	
50 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	1	0	0	
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	9	2	0	-	-	
	Reddish tear	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	-	-	
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	0	-	-	
	Soil of periocular fur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-	-	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-	-	
100 mg/kg	Number of animals examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	4	1	1	1	1	
	No abnormal findings	3	1	3	3	3	3	3	3	2	3	1	2	3	2	2	2	5	3	2	0	1	0	0	0	1	
	Clonic convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
	Reddish tear	5	6	5	6	5	6	5	4	5	6	7	6	6	7	7	7	4	6	5	8	3	1	1	1	0	
	Salivation	6	6	6	6	6	6	6	6	7	6	8	6	6	6	6	6	4	4	6	8	3	1	1	1	0	
	Soft feces	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soil of perigenital fur	2	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soil of periocular fur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	
	Soil of perioral fur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	1	0	0	0	0	
	Tachypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
	Tremor	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	2	0	0	0	0	

Values are number of animal with findings.

- : Blank.

(to be continued)

Table 2 General appearance of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) (continued-2)

Group	Findings	Lactation period (day)		Autopsy day
		0-2	3	
0 mg/kg	Number of animals examined	10	10	10
	No abnormal findings	10	10	10
25 mg/kg	Number of animals examined	11	11	11
	No abnormal findings	11	11	11
50 mg/kg	Number of animals examined	11	11	11
	No abnormal findings	11	11	11
100 mg/kg	Number of animals examined	1	1	1
	No abnormal findings	0	1	1
	Crawling position	1	0	0

Values are number of animal with findings.

Table 3 Body weight of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group		Body weight (g) on administration period (day)										Body weight gain	
												Day 1-42	
		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	g	%
0 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	MEAN	364.9	369.6	379.8	392.3	405.4	419.5	444.5	467.8	491.3	505.7	140.8	38.596
	S.D.	13.6	14.7	16.2	16.5	18.2	17.2	17.3	16.2	19.0	22.0	15.4	4.281
25 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	MEAN	367.5	370.7	383.3	393.8	406.1	417.7	438.9	456.4	481.7	494.7	127.2	34.538
	S.D.	14.9	16.5	18.1	20.6	21.4	24.4	22.3	22.8	25.5	28.0	14.7	2.977
50 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	MEAN	366.1	368.8	386.3	394.4	407.2	418.3	440.6	460.2	483.3	494.5	128.4	34.980
	S.D.	16.7	17.3	20.3	22.3	24.1	24.3	27.1	30.3	32.9	35.1	21.5	4.951
100 mg/kg	N	12	12	12	11	11	11	11	11	10	10	10	10
	MEAN	367.0	362.0	365.1	369.8*	378.5*	387.2**	405.0**	418.5**	435.4**	445.1**	74.9**	20.162**
	S.D.	15.9	15.2	19.1	18.9	22.1	25.2	29.8	31.7	35.4	33.7	24.7	6.470

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 1) x 100.

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 4 Body weight before gestation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group		Body weight (g) on pre-mating period (day)						Body weight gain	
		1	2	5	7	10	14	Day 1-14	
								g	%
0 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12
	MEAN	254.3	250.8	262.4	265.1	271.3	278.5	24.2	9.325
	S.D.	15.4	19.2	20.1	25.1	28.2	29.0	17.3	6.268
25 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12
	MEAN	254.8	252.8	259.8	262.3	266.3	272.0	17.3	6.797
	S.D.	10.4	9.7	11.4	10.8	10.8	12.6	8.5	3.342
50 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12
	MEAN	253.8	251.3	260.4	263.3	269.7	273.1	19.3	7.441
	S.D.	13.3	15.8	18.1	21.5	25.3	25.6	15.1	5.265
100 mg/kg	N	12	12	12	12	11	9	9	9
	MEAN	253.0	249.6	252.3	250.5	257.5	264.0	10.4	4.216
	S.D.	13.7	12.4	13.6	13.0	12.9	14.0	9.5	3.790

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 1) x 100.

Table 5 Body weight during gestation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group		Body weight (g) on gestation period (day)									Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	17	20	Day 0-20	
											g	%
0 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	MEAN	296.6	303.2	319.0	328.1	337.6	354.3	377.9	410.2	457.6	161.0	54.491
	S.D.	28.4	27.1	30.2	30.4	32.9	33.8	37.3	41.5	42.9	24.1	8.101
25 mg/kg	N	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	MEAN	281.2	287.8	300.5	311.8	321.4	339.8	364.1	395.9	441.7	160.5	57.345
	S.D.	16.4	13.8	14.7	15.4	16.2	17.5	19.4	21.0	23.3	21.0	8.758
50 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	MEAN	281.8	289.3	303.7	312.0	322.0	339.8	362.7	397.2	442.7	160.9	57.213
	S.D.	19.3	20.2	21.2	19.2	19.0	24.2	25.6	25.1	30.9	18.6	6.505
100 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8	7	7	7
	MEAN	268.4*	274.0*	285.8**	294.4**	302.0**	319.6*	338.5**	367.1**	404.9**	137.9	51.784
	S.D.	18.6	16.6	18.7	17.6	18.1	17.7	18.5	23.4	29.4	18.4	7.580

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 0) x 100.

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 6 Body weight during lactation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group		Body weight (g) on lactation period (day)			Body weight gain	
		0	1	4	Day 0-4	
					g	%
0 mg/kg	N	10	10	10	10	10
	MEAN	348.6	352.3	369.9	21.3	6.165
	S.D.	41.7	42.1	45.5	13.4	3.803
25 mg/kg	N	11	11	11	11	11
	MEAN	332.9	338.8	351.8	18.9	5.726
	S.D.	17.5	16.8	17.9	9.9	3.058
50 mg/kg	N	11	11	11	11	11
	MEAN	324.1	327.3	344.4	20.3	6.274
	S.D.	13.5	16.6	14.3	6.4	1.977
100 mg/kg	N	1	1	1	1	1
	MEAN	301.0	289.0	313.0	12.0	3.990
	S.D.					

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 0) x 100.

Values in 100 mg/kg group are excluded from statistical calculation.

Table 7 Food consumption of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group		Food consumption (g/rat/day) on administration period (day)								
		1	2	5	7	10	14	28	35	42
0 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	11	11	12
	MEAN	26.92	25.42	26.80	25.38	26.36	25.58	26.44	26.97	26.23
	S.D.	1.56	1.38	1.34	1.54	1.84	1.40	1.28	1.37	1.43
25 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	MEAN	26.92	24.42	25.97	26.08	26.03	25.73	26.00	26.41	26.35
	S.D.	2.47	2.84	2.16	2.75	2.36	2.63	1.83	2.15	2.73
50 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	MEAN	26.08	22.08**	26.20	25.08	25.75	25.17	25.89	25.96	25.66
	S.D.	2.27	2.50	2.56	2.81	2.43	2.27	2.17	2.04	2.23
100 mg/kg	N	12	12	12	11	11	11	10	9	10
	MEAN	26.08	19.42**	20.86**	20.45**	21.78**	22.65**	24.90	24.29*	24.30
	S.D.	2.19	3.34	3.02	2.61	2.78	2.49	2.37	2.47	2.29

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 8 Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group		Food consumption (g/rat/day) on pre-mating period (day)					
		1	2	5	7	10	14
0 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12
	MEAN	20.25	17.08	20.32	19.50	20.15	20.43
	S.D.	2.83	3.92	2.80	4.06	3.49	3.35
25 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12
	MEAN	21.00	17.25	19.14	19.29	19.18	19.69
	S.D.	2.34	3.36	1.94	1.85	1.45	1.33
50 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12
	MEAN	20.58	16.50	18.95	19.25	19.89	19.52
	S.D.	2.23	3.90	2.27	3.19	2.91	2.97
100 mg/kg	N	12	12	12	12	11	9
	MEAN	19.25	14.08	15.46**	14.17++	16.57++	17.49+
	S.D.	3.25	1.93	1.62	1.45	0.87	1.27

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

+ : Significantly different from 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 9 Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group		Food consumption (g/rat/day) on gestation period (day)							
		1	3	5	7	10	14	17	20
0 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	MEAN	19.30	25.00	25.65	26.50	27.10	27.84	27.61	24.33
	S.D.	2.54	3.10	2.54	3.78	3.38	3.30	3.21	2.18
25 mg/kg	N	11	11	11	11	11	11	11	11
	MEAN	19.09	24.32	25.73	26.14	27.25	27.43	27.05	24.31
	S.D.	1.87	1.60	2.10	2.34	1.69	1.80	1.86	1.77
50 mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12
	MEAN	18.33	24.38	24.42	25.50	26.53	26.71	27.01	24.25
	S.D.	2.74	2.18	2.42	1.67	2.82	2.46	2.40	2.17
100 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	7
	MEAN	17.88	21.88*	22.44*	22.81+	24.10*	25.31	26.36	23.30
	S.D.	1.36	1.43	1.61	1.81	1.43	1.03	1.80	1.76

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

+ : Significantly different from 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 10 Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group		Food consumption (g/rat/day) on lactation period (day)	
		1	4
0 mg/kg	N	10	10
	MEAN	20.70	37.37
	S.D.	7.69	4.50
25 mg/kg	N	11	11
	MEAN	22.09	37.18
	S.D.	3.70	5.59
50 mg/kg	N	11	11
	MEAN	18.73	36.66
	S.D.	3.64	2.66
100 mg/kg	N	1	1
	MEAN	14.00	26.30
	S.D.		

Values in 100 mg/kg group are excluded from statistical calculation.

Table 11 Gross findings of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Item	Group	0 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
Number of dead animals		0	0	0	2
No abnormal findings		-	-	-	2
Number of surviving animals		12	12	12	10
No abnormal findings		11	9	12	9
Organ : Findings					
Ileum : Diverticulum		0	1	0	0
Testis : Atrophy, unilateral		0	1	0	0
Epididymis : Atrophy, unilateral		0	1	0	0
Yellowish white patch, cauda, unilateral		0	1	0	0
Yellowish white mass, cauda, unilateral		0	0	0	1
Cerebrum : Dilatation, ventricle		1	0	0	0

Values are number of animals with findings.

Table 12 Gross findings of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Item	Group	0 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
Number of dead animals (pre-mating period)		0	0	0	3
No abnormal findings		-	-	-	3
Number of pregnant animals		11	11	12	8
No abnormal findings		11	11	11	1
Number of dead animals		0	0	1	7
No abnormal findings		-	-	1	7
Number of non-pregnant animals		1	1	0	1
No abnormal findings		0	1	0	1
Organ : Findings					
Uterus : Dilatation, Iumen		1	0	0	0
Vagina : Atresia		1	0	0	0

Values are number of animals with findings.

- : Blank.

Table 13 Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Thymus		Adrenal	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
0 mg/kg	12	MEAN	507.5	16.792	3.309	3.237	0.637	0.833	0.163	1.349	0.267	2.201	0.434	339.2	66.923	63.7	12.521
		S.D.	21.2	1.529	0.251	0.291	0.057	0.079	0.016	0.098	0.019	0.091	0.022	50.3	10.082	12.5	2.232
25 mg/kg	12	MEAN	498.8	16.464	3.292	3.214	0.644	0.816	0.164	1.362	0.273	2.243	0.451	317.0	63.152	62.8	12.605
		S.D.	26.7	2.078	0.264	0.298	0.044	0.083	0.021	0.117	0.016	0.098	0.039	70.2	11.013	7.3	1.370
50 mg/kg	12	MEAN	499.3	17.164	3.436	3.146	0.630	0.788	0.158	1.371	0.275	2.193	0.441	351.0	70.341	58.6	11.813
		S.D.	35.8	1.593	0.145	0.271	0.038	0.130	0.019	0.123	0.016	0.103	0.024	52.7	9.650	8.7	2.073
100 mg/kg	10	MEAN	448.0**	15.327	3.417	3.139	0.702**	0.700**	0.155	1.280	0.287*	2.154	0.485+	247.6**	55.692*	74.9	16.625**
		S.D.	34.2	1.624	0.174	0.245	0.035	0.083	0.012	0.087	0.013	0.124	0.054	44.1	11.220	16.1	2.815

Group	Number of animals		Testis		Epididymis	
			g	%	g	%
0 mg/kg	12	MEAN	3.129	0.617	1.310	0.258
		S.D.	0.218	0.040	0.087	0.015
25 mg/kg	12	MEAN	3.186	0.638	1.318	0.264
		S.D.	0.402	0.079	0.145	0.026
50 mg/kg	12	MEAN	3.342	0.670	1.319	0.263
		S.D.	0.294	0.050	0.096	0.014
100 mg/kg	10	MEAN	3.421	0.767**	1.330	0.296**
		S.D.	0.173	0.059	0.124	0.025

* : Significantly different from 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

+ : Significantly different from 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 14 Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Thymus		Adrenal	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
0 mg/kg	10	MEAN	369.9	14.120	3.829	2.127	0.579	0.787	0.213	1.059	0.289	2.053	0.562	250.8	66.309	81.6	22.426
		S.D.	45.5	1.480	0.246	0.209	0.065	0.120	0.032	0.114	0.017	0.058	0.065	134.5	32.010	15.4	5.258
25 mg/kg	11	MEAN	351.8	14.100	4.007	2.077	0.591	0.748	0.215	1.085	0.309*	2.019	0.575	243.2	69.140	89.0	25.224
		S.D.	17.9	1.291	0.270	0.164	0.029	0.116	0.040	0.076	0.021	0.078	0.035	46.0	12.420	15.4	3.605
50 mg/kg	11	MEAN	344.4	14.275	4.145*	2.155	0.625	0.660*	0.190	1.045	0.303	2.077	0.604	222.9	64.763	84.4	24.485
		S.D.	14.3	1.126	0.287	0.159	0.032	0.088	0.024	0.086	0.018	0.086	0.025	65.4	18.868	13.3	3.569
100 mg/kg	1	MEAN	313.0	13.830	4.420	2.030	0.650	0.640	0.200	0.880	0.280	1.940	0.620	203.0	64.860	87.0	27.800
		S.D.															
Group	Number of animals		Ovary														
			mg	10 ⁻³ %													
0 mg/kg	10	MEAN	113.7	31.001													
		S.D.	13.4	4.446													
25 mg/kg	11	MEAN	115.1	32.724													
		S.D.	14.7	3.890													
50 mg/kg	11	MEAN	120.1	34.928													
		S.D.	14.9	4.648													
100 mg/kg	1	MEAN	110.0	35.140													
		S.D.															

* : Significantly different from 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

Values in 100 mg/kg group are excluded from statistical calculation.

Table 15 Histopathological findings of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Item			0 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals examined			12	3	0	12
Organ: Findings	Grade					
Testis: Atrophy, seminiferous tubule	+++		0	1 (1)	-	0
Hyperplasia, interstitial cell	+		0	1 (1)	-	0
Epididymis: Decrease, sperm	+++		0	1 (2)	-	0
Cell debris, lumen	+		0	1 (2)	-	0
Spermatic granuloma	+		0	1 (2)	-	1
Ileum: Diverticulum	+		-	1 (1)	-	-
Cerebrum: Dilatation, ventricle	+		1 (1)	-	-	-

Values are number of animals with findings.

Values in parentheses are number of animals examined.

-: Blank.

Grade; +: slight change, +++: severe change.

Table 16 Histopathological findings of female rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Item		0 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals examined		12	0	0	12
Organ: Findings	Grade				
Ovary: Abnormal findings		0	-	-	0
Uterus: Dilatation, lumen	+	1 (1)	-	-	-
Vagina: Atresia	+	1 (1)	-	-	-
Cellular infiltration, inflammatory cell, lamina propria	+	1 (1)	-	-	-

Values are number of animals with findings.

Values in parentheses are number of animals examined.

-: Blank.

Grade; +: slight change.

Table 17 Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

			Stage I-VI							
			Number of cells							
Group	Number of animals		Sertoli cells	Spermatogonia		Pachytene spermatocytes		Round spermatids		
			/ST	/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC	
0 mg/kg	12	MEAN	22.12	20.03	0.907	49.33	2.235	123.78	5.607	
		S.D.	1.19	2.82	0.119	2.79	0.146	10.53	0.499	
100 mg/kg	12	MEAN	21.67	19.67	0.910	50.02	2.309	128.20	5.928	
		S.D.	1.03	2.88	0.142	4.52	0.195	10.53	0.561	

			Stage VII-VIII								
			Number of cells								
Group	Number of animals		Sertoli cells	Spermatogonia		Preleptotene spermatocytes		Pachytene spermatocytes		Round spermatids	
			/ST	/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC
0 mg/kg	12	MEAN	20.40	2.05	0.100	39.05	1.923	55.03	2.716	111.67	5.497
		S.D.	1.38	0.64	0.027	2.61	0.198	5.84	0.390	9.86	0.604
100 mg/kg	12	MEAN	20.35	2.07	0.103	44.73**	2.213*	59.50*	2.944	122.32**	6.040*
		S.D.	1.65	0.54	0.031	4.68	0.304	3.91	0.339	8.15	0.562

ST : Seminiferous tubule.

SC : Sertoli cell per seminiferous tubule.

(to be continued)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 17 Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134) (continued)

Group	Number of animals		Stage IX-XI						
			Number of cells						
			Sertoli cells	Spermatogonia		Leptotene spermatocytes		Pachytene spermatocytes	
				/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC
0 mg/kg	12	MEAN	21.43	3.23	0.152	43.35	2.043	56.88	2.674
		S.D.	2.01	0.81	0.039	3.53	0.271	4.77	0.330
100 mg/kg	12	MEAN	22.50	4.87**	0.218**	49.45**	2.206	61.52*	2.741
		S.D.	1.52	1.11	0.058	4.96	0.266	5.86	0.282

Group	Number of animals		Stage XII-XIV						
			Number of cells						
			Sertoli cells	Spermatogonia		Spermatocytes 1		Spermatocytes 2	
				/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC
0 mg/kg	12	MEAN	21.25	3.82	0.182	46.37	2.193	60.80	2.878
		S.D.	1.84	0.76	0.042	3.71	0.199	4.39	0.284
100 mg/kg	12	MEAN	21.60	4.77*	0.220	52.08**	2.412**	65.62*	3.041
		S.D.	1.15	1.04	0.050	3.94	0.146	4.57	0.213

ST : Seminiferous tubule.

Spermatocytes 1 : Zygotene / Pachytene spermatocytes.

SC : Sertoli cell per seminiferous tubule.

Spermatocytes 2 : Pachytene / Diplotene spermatocytes.

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 18 Reproduction performance of parental rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group	Estrous cycle			Copulation index		Fertility index	Gestation index	Gestation length (days)	Nursing index	
	Abnormality		Length (days)	Male	Female	Incidence (%)	Incidence (%)		Incidence (%)	
	Incidence (%)			Incidence (%)	Incidence (%)					
0 mg/kg	2/12 16.7)	MEAN S.D.	4.30 0.54	11/12 (91.7)	12/12 00.0)	11/12 91.7)	10/11 90.9)	MEAN S.D.	22.5 0.5	10/10 00.0)
25 mg/kg	0/12 0.0)	MEAN S.D.	4.19 0.33	12/12 00.0)	12/12 00.0)	11/12 91.7)	11/11 00.0)	MEAN S.D.	22.3 0.5	11/11 00.0)
50 mg/kg	1/12 8.3)	MEAN S.D.	4.12 0.23	12/12 00.0)	12/12 00.0)	12/12 00.0)	11/11 00.0)	MEAN S.D.	22.3 0.5	11/11 00.0)
100 mg/kg	1/9 11.1)	MEAN S.D.	4.50 0.33	8/9 88.9)	9/9 00.0)	8/9 88.9)	[1/1 00.0)	MEAN S.D.	22.0	1/1 00.0)

Abnormal estrous cycle = (number of female with abnormal estrous cycle / number of females examined) x 100.

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

Fertility index = (number of pregnant females / number of pairs with successful copulation) x 100.

Gestation index = (number of females with live pups / number of pregnant females) x 100.

Nursing index = (number of females nursing live pups on lactation day 4 / number of females with live pups delivery) x 100.

[] : Excluded from the statistical calculation.

Table 19 Pregnancy and litter data of rats dosed orally with Trimethylbenzylammonium Chloride in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08134)

Group		Number of corpora lutea	Number of implantation sites	Implantation index (%)	Delivery index (%)	Number of pups delivered	Lactation day 0			Lactation day 4			
							Number of live pups	Sex ratio		Live birth index (%)	Number of live pups	Sex ratio Live pups	Viability index (%)
								All pups	Live pups				
Pup data													
0 mg/kg	N	11	11	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	MEAN	15.2	14.5	92.279	94.027	14.8	14.5	0.553	0.568	98.000	14.3	0.553	98.666
	S.D.	3.3	4.4	19.753	5.330	0.8	1.0	0.106	0.130	4.499	0.9	0.088	2.812
25 mg/kg	N	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	MEAN	16.2	15.8	97.715	96.038	15.2	15.1	0.501	0.505	99.432	14.9	0.500	98.888
	S.D.	1.5	1.7	4.361	4.115	1.7	1.7	0.119	0.122	1.884	1.6	0.116	2.486
50 mg/kg	N	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	MEAN	16.8	16.3	97.438	93.209	15.1	15.0	0.522	0.523	99.243	14.8	0.524	98.788
	S.D.	2.4	1.7	3.910	9.044	2.2	2.4	0.141	0.138	2.512	2.4	0.138	4.019
100 mg/kg	N	8	8	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	MEAN	15.8	14.3	90.228	75.000	6.0	6.0	0.500	0.500	100.000	6.0	0.500	100.000
	S.D.	1.5	3.0	15.598									

Implantation index = (Number of implantation sites / number of corpora lutea) x 100.

Delivery index = (Number of pups born / number of implantation sites) x 100.

Sex ratio on Lactation day 0 = (number of male pups born / number of pups born) or (number of live male pups / number of live pups).

Sex ratio on Lactation day 4 = number of live male pups / number of live pups.

Live birth index = (Number of live pups on lactation day 0 / number of pups born) x 100.

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

[] : Excluded from the statistical calculation.

Table 20 General appearance of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of Trimethylbenzylammonium Chloride in rats (SR08134)

Group	Findings	Male					Female				
		Day of lactation period					Day of lactation period				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
0 mg/kg	Number of pups examined	82	80	80	80	80	66	65	64	64	64
	No abnormal findings	80	80	80	80	79	65	64	64	64	64
	Death	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	Milk-band negative	2	-	-	-	1	1	0	-	-	-
	Lost	0	-	-	-	0	0	1	-	-	-
25 mg/kg	Number of pups examined	84	84	83	82	82	83	82	82	82	82
	No abnormal findings	84	82	82	82	82	82	82	82	82	82
	Milk-band negative	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Death	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
	Milk-band positive	-	0	0	-	-	1	-	-	-	-
	Lost	-	1	1	-	-	0	-	-	-	-
50 mg/kg	Number of pups examined	87	87	86	86	86	79	78	77	77	77
	No abnormal findings	86	86	86	86	86	77	77	77	76	75
	Milk-band negative	1	0	0	0	0	1	0	0	1	2
	Death	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
	Milk-band negative	-	0	-	-	-	1	0	-	-	-
	Lost	-	1	-	-	-	0	1	-	-	-
100 mg/kg	Number of pups examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No abnormal findings	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Values are number of animals with findings.

Table 21 Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of Trimethylbenzylammonium Chloride in rats (SR08134)

Group		Male			Female		
		Body weight (g) on lactation period (day)			Body weight (g) on lactation period (day)		
		0	1	4	0	1	4
0 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
	MEAN	6.82	7.39	10.61	6.26	6.86	10.00
	S.D.	0.58	0.70	1.03	0.65	0.66	0.99
25 mg/kg	N	11	11	11	11	11	11
	MEAN	6.61	7.25	10.52	6.25	6.85	9.90
	S.D.	0.41	0.52	0.60	0.36	0.46	0.63
50 mg/kg	N	11	11	11	11	11	11
	MEAN	6.54	7.24	10.59	6.18	6.80	9.85
	S.D.	0.28	0.47	1.22	0.35	0.53	1.25
100 mg/kg	N	1	1	1	1	1	1
	MEAN	7.00	7.60	11.70	6.70	7.40	11.20
	S.D.						

Values in 100 mg/kg group are excluded from statistical calculation.

Table 22 Gross findings of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of Trimethylbenzylammonium Chloride in rats (SR08134)

Item	Group	Male				Female			
		0 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Findings of dead pups during days 0-4 of lactation									
Number of pups examined		3	2	1	0	2	1	2	0
No abnormal findings		2	0	0	-	1	1	1	-
Intraperitoneum : Autolysis		1	0	0	-	0	0	0	-
Lost		0	2	1	-	1	0	1	-
Findings of pups euthanized on day 4 of lactation									
Number of pups examined		79	82	86	3	64	82	77	3
No abnormal findings		79	82	86	3	63	81	77	3
Kidney : Dilation, renal pelvis, bilateral		0	0	0	0	1	1	0	0
Ureter : Dilation, bilateral		0	0	0	0	0	1	0	0
Urinary bladder : Dilation		0	0	0	0	0	1	0	0

Values are number of pups with findings.