

2,4-ジクロロニトロベンゼンのラットを用いた反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：2282（115-025）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

1. 要 約	1 頁
2. 諸 言	3
3. 試 験 題 目	4
4. 試 験 目 的	4
5. 試 験 番 号	4
10. 被 験 物 質	6
11. 試 験 材 料 お よ び 方 法	8
12. 試 験 結 果	17
13. 考 察 お よ び 結 論	22
14. 参 考 文 献	25

Figures, Tables and Reference data

Figure 1	Body weight change of male rats
Figure 2	Body weight change of female rats
Figure 3	Food consumption of male rats
Figure 4	Food consumption of female rats
Table 1-1	Mortality of rats
Table 1-2	Clinical observations on male rats
Table 1-3	Clinical observations on female rats (Before and during mating period)
Table 1-4	Clinical observations on female rats (Gestation period)
Table 1-5	Clinical observations on female rats (Lactation period)
Table 2-1	Body weight change of male rats
Table 2-2	Body weight change of female rats
Table 3-1	Food consumption of male rats
Table 3-2	Food consumption of female rats
Table 4	Hematology of male rats
Table 5	Blood chemistry of male rats
Table 6-1	Absolute and relative organ weight of male rats
Table 6-2	Absolute and relative organ weight of female rats
Table 7-1	Summary of gross findings (successful pregnancy, male)
Table 7-2	Summary of gross findings (day 4 of lactation, female)
Table 7-3	Summary of gross findings (not copulation, male)
Table 7-4	Summary of gross findings (dead, female)
Table 7-5	Summary of gross findings (all pups died)
Table 7-6	Summary of gross findings (dead, female)

Table 8-1	Summary of histological findings (successful pregnancy, male)
Table 8-2	Summary of histological findings (day 4 of lactation, female)
Table 8-3	Summary of histological findings (not copulation, male)
Table 8-4	Summary of histological findings (not copulation, female)
Table 8-5	Summary of histological findings (dead, male)
Table 8-6	Summary of histological findings (all pups died)
Table 8-7	Summary of histological findings (dead, female)
Table 9	Copulation and fertility results in rats
Table 10	Findings of delivery in dams(F0)
Table 11	External observations on live pups(F1) from rats
Table 12	Body weight change of pups(F1) from rats
Table 13-1	Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, male)
Table 13-2	Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, female)

1. 要 約：

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、2,4-ジクロロニトロベンゼンの0（溶媒対照群）、8、40および200 mg/kg/dayをラットの交配前14日から交配期間、妊娠期間および哺育3日まで連続経口投与し、反復投与毒性に加えて生殖・発生に及ぼす影響を検討した。

1) 反復投与毒性

一般状態には被験物質投与の影響は認められなかったが、雌の200 mg/kg群で分娩中に1例被験物質投与によると考えられる死亡が観察された。雌の200 mg/kg群で妊娠期間中に体重増加抑制が認められたが、雄の体重および雌雄の摂餌量に被験物質投与の影響は認められなかった。

雄の血液学的検査では、8 mg/kg以上の投与群で赤血球数が低値を、40および200 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量が低値を、網赤血球比率が高値を示し、軽微ながら貧血傾向が認められた。血液化学的検査では、40および200 mg/kg群で総蛋白、アルブミンおよび γ -GTPが高値を、クレアチニンが低値を、さらに200 mg/kg群で総ビリルビンおよびA/Gが高値を示した。

器官重量は雌雄の200 mg/kg群で肝臓、腎臓の実重量および相対重量が増加または増加傾向を示し、剖検所見でも雌雄の200 mg/kg群で肝臓の肥大が、雄の200 mg/kg群で腎臓の肥大が観察された。その他、被験物質投与に起因すると考えられる胸腺の萎縮または副腎の肥大が雌の被験物質投与群で観察された。病理組織学検査では、被験物質投与の影響と考えられる所見が肝臓および腎臓に認められ、肝臓に関しては、雌雄の200 mg/kg群で肝細胞腫脹および単細胞壊死が観察された。さらに、雄の同群で肝臓の核分裂像が観察された。腎臓に関しては、雄に尿細管上皮の硝子滴変性が、雌に好塩基性化が200 mg/kg群にやや多く観察され、さらに雌では少数例ではあるが空胞化が8 mg/kg以上の投与群で、尿細管上皮の壊死が40および200 mg/kg群で観察された。200 mg/kg群の死産児のみを娩出した雌および全児死亡の認められた雌に、脾臓の中等度の色素沈着、胸腺の萎縮、肝細胞腫脹、胃、十二指腸および大腸の潰瘍、肝臓の単細胞壊死、腎臓の尿細管上皮の壊死、好塩基性化、空胞化および線維化などが観察された。

なお、対照群および200 mg/kg群の精巣について、ステップⅥの精細管の精上皮細胞数を測定した結果、被験物質投与の影響は認められなかった。

2) 生殖発生毒性

交尾能、受胎能および性周期観察では、被験物質投与の影響は認められなかった。分娩時観察では、200 mg/kg 群で分娩中の死亡が1例認められた。また、同群で死産児のみを娩出した動物が2例、哺育期間中に全児死亡が認められた動物が3例観察され、出産生児数の減少、死産児数の増加傾向、出生率、新生児の生後4日生存率および分娩率の低値または低値傾向が認められ、分娩あるいは哺育機能の障害を惹起する可能性が示唆された。なお、妊娠期間および分娩時間に被験物質投与の影響は認められなかった。新生児の外表検査では、被験物質投与に起因すると考えられる異常は観察されず、体重も哺育4日まで順調に増加した。死産児、死亡児および哺育4日の剖検でも被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。

以上の結果から、2,4-ジクロロニトロベンゼンの反復投与毒性は、雌雄とも 8 mg/kg/day 以上の投与で認められ、無影響量は 8 mg/kg/day未満と推察される。また、雄の生殖に及ぼす影響は 200 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量は 200 mg/kg/dayと推察される。雌の生殖および児動物の発生・発育に及ぼす影響は 200 mg/kg/day投与で認められ、無影響量は 40 mg/kg/day と推察される。

2. 諸 言:

2,4-ジクロロニトロベンゼン (2,4-dichloronitrobenzene) は化学産業の分野において有機合成や染料の原料として使用されている化合物である。本化合物の毒性についてはほとんど知られていない。一方、本化合物の類似物質であるニトロベンゼンやジニトロベンゼンについては、メトヘモグロビン形成能を有し、精巣の精細管上皮のセルトリ細胞に対して直接障害を及ぼすなど精巣毒性の認められる物質として報告されている^{1) 2) 3) 4)}。今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、2,4-ジクロロニトロベンゼンの反復投与毒性および生殖・発生毒性について検討したのでその結果を報告する。

3. 試験題目： 2,4-ジクロロニトロベンゼンのラットを用いた反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験
4. 試験目的： 既存化学物質の毒性学的性質を評価する一貫として行う OECD ガイドライン「反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験、Etended Steering Group Document No. 3」（1990年3月22日）に従って、ラットを用いて一般毒性学的影響に加えて生殖・発生に及ぼす影響を検討した。なお、試験の実施は環企研第 233号、衛生第38号、63基局第 823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」の基準を満たすものとした。
5. 試験番号： 2282（115-025）

10. 被 験 物 質 :

- 1) 被験物質名 2,4-ジクロロニトロベンゼン
- 2) CAS No. 611-06-3
- 3) ロット番号
- 4) 含有量 98.0%以上
- 5) 提供先
- 6) 保管条件 室温、密封、遮光
- 7) 保管場所 安評センター被験物質保管庫
- 8) 化学名 2,4-ジクロロニトロベンゼン
- 9) 構造式
- O=[N+]([O-])c1cc(Cl)ccc1Cl
- 10) 分子式 $C_6H_3NO_2Cl_2$
- 11) 分子量 192.0
- 12) 物質の状態 固体 (常温)
- 13) 色 黄色結晶
- 14) 融点/沸点 $33^{\circ}C / 258.5^{\circ}C$
- 15) 溶解性 油溶性

- 16) 比 重 1.439 (80°C)
- 17) 蒸 気 圧 12 mmHg (131°C)
- 18) 取り扱い上の注意 取り扱い中は必要に応じて適切な保護メガネ、保護手袋、保護マスクを着用し、取り扱い後は手洗いおよびうがいを充分行う。
火気、静電気などによる着火源が生じないようにする。
- 19) 被験物質保管および 投与終了後、約 2 g を安評センターに保管し、残りは廃棄した。
残余被験物質の処理

なお、実測した結果を Reference data 2 に示した。

1.1. 試験材料および方法：

1) 供試動物

供試したSD系ラット (Crj:CD(SD), SPF) は、日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県厚木市) から生後8週齢の雌雄各70匹を平成5年9月20日に購入し、7日間検疫・馴化飼育した。馴化期間中、一般状態に異常が認められなかった動物を8日間の予備飼育後、10週齢で群分けして雌雄各48匹を試験に用いた。

群分け終了時の体重は、雄で352~397 g、雌で227~253 gであった。

2) 種属選択理由

OECDガイドラインにおいてラットの使用が指示されている。系統は、性周期、繁殖性および遺伝的安定性を考慮して選んだ。

3) 飼育

動物は、温度22~26℃、湿度45~65%、換気回数15回/時間、照度150~300 lux、照明時間12時間 (午前7時点灯、午後7時消灯) に設定されたバリアシステムの飼育室

(W 5.7 × D 10.0 × H 2.5 m、142.5 m³) で飼育した。

株式会社 東京技研サービス (東京都府中市) の自動水洗式飼育機 (W 691.0 × D 79.0 × H 195.0 cm) を使用し、アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 15.8 × D 23.8 × H 16.0 cm、飼育ケージ・スペース 6,017 cm³) に動物を1匹ずつ収容し飼育した。但し、交配期間中は、雄をアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 36.8 × D 25.0 × H 16.0 cm、飼育ケージ・スペース 14,720 cm³) に収容し飼育した。妊娠18日以降の母動物は哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 36.8 × D 25.0 × H 16.0 cm) に哺育トレイおよび巣作り材料 (アルファードライ) を入れて飼育した。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回交換した。

飼料は、オリエンタル酵母工業株式会社 (東京都中央区) 製造のNMF固型飼料 (放射線滅菌飼料) を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。本試験に使用した飼料中の汚染物質の分析は、オリエンタル酵母工業株式会社が財団法人 日本食品分析センター (東京都渋谷区) に依頼し実施した。その分析成績書は、Reference data 3 に示した。

飲水は、水道水を自由に摂取させた。水道水の分析は1年に4回、財団法人 静岡県生活科学検査センター (静岡県浜松市) で実施しその水質検査成績書は、Reference data 4に示した。供給した飼料、水および巣作り材料には試験に支障を来す可能性の考えられる夾雑物の混在はなかった。

なお、動物の飼育期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

4) 群分け

動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように平成5年10月5日に群分けした。

動物の識別は個体別に耳パンチをするとともに個体別飼育ケージに動物標識番号 (Animal ID-No.) を付すことにより行った。但し、群分け前までは仮番号により管理した。

余剰動物は炭酸ガスにより安楽死させた。

5) 試験群の構成

1 対照群および3 被験物質投与群の計4 群とした。

性	試験群	用 量 (mg/kg)	動物数	動 物 番 号
雄	1	0 (対照群)*	12	1001 ~ 1012
	2	8	12	1101 ~ 1112
	3	40	12	1201 ~ 1212
	4	200	12	1301 ~ 1312
雌	1	0 (対照群)*	12	2001 ~ 2012
	2	8	12	2101 ~ 2112
	3	40	12	2201 ~ 2212
	4	200	12	2301 ~ 2312

* コーンオイルのみを投与した。

6) 用量設定理由

本試験の用量は先に実施した「ラットを用いた反復投与毒性/生殖発生毒性併合予備試験 (試験番号2264)」の結果を参考にして決定した。すなわち、0、50、100、200 および 400 mg/kg を雄および雌に14日間連続投与した結果、400 mg/kg 群の雄で6例中1例、雌で6例中4例が死亡した。また、400 mg/kg 群の雄で体重増加抑制および摂餌量の低値がみられた。

剖検時の器官重量は、200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で肝臓の実重量および相対重量がともに高値または高値傾向を示した。

剖検では、100 mg/kg 以上の投与群の雄および 200 mg/kg 以上の投与群の雌で肝臓の肥大がみられた。

以上の結果から、本試験の投与期間が長期間になることを考慮し、最高用量として 200 mg/kg を設定し、以下公比5にて除し 40 および 8 mg/kg を設定した。

7) 被験物質の調製および均一性／濃度分析

必要量の被験物質をコーンオイル（ナカライテスク株式会社、京都府京都市）に溶解し、1.6、8 および 40 mg/ml の指定濃度に調製した。調製後は、使用時まで冷蔵庫に保存した。調製液中の被験物質は Reference data 5 に示した如く、1.6 mg/ml の場合、冷暗条件下で少なくとも 8 日間安定であることが確認されたことから、調製は 1 週間に 1 回以上の頻度で実施し、調製後 7 日以内に使用した。

投与液の均一性／濃度分析は、調製開始時に調製した各群のバッチから無作為にサンプルを抽出し実施した。その結果、Reference data 5 に示した如く、各濃度の平均値は設定濃度の 102～105 %、変動係数は 1.6% 以下であり、適切に調製されており問題はなかった。

8) 投与方法および投与期間

投与経路は、OECDガイドライン「反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」で指示されている投与経路に準じて強制経口投与を選択した。

投与容量は、体重 100 g 当り 0.5 ml とし、個体別に測定した最新体重に基づいて算出した。胃ゾンデを用いて毎日 1 回（7 日／週）強制経口投与した。対照群にはコーンオイルのみを同様に投与した。

雄の投与期間は、交配前 14 日間と交配期間の 14 日間を含めて交配期間終了後 17 日間の連続 45 日間とした。雌の投与期間は、交配前 14 日間と交配期間中（交尾成立まで最長 14 日間）および交尾成立後の妊娠期間を通じて分娩後の哺育 3 日まで（41～46 日間）とした。なお、交尾の成立しなかった雌は交配期間終了後の解剖前日まで 45 日間とした。

9) 観察、測定および検査

a. 雄動物

(1) 一般状態の観察

全例について、試験期間中 1 日 1 回以上の頻度で観察した。

(2) 体重測定

全例について、投与 0（投与開始日）、7、14、21、28、35、42 および 45 日（剖検日）に測定した。また、投与期間中の体重増加量を算出した。

(3) 摂餌量の測定

全例について、投与 0（投与開始日）、7、14、21、28、35、42 および 44 日（剖検前日）に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均 1 日摂餌量を算出した。また、投与期間中の累積摂餌量を算出した。なお、交配期間における同居中の摂餌量は測定しなかった。

(4) 血液学的検査

全例について、投与期間（45日間）終了日の夕方から翌朝まで約16時間絶食させた後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血した。検査には初血を用いた。抗凝固剤（EDTA-3K）を加えたサンプルカップに血液を採取し、総合血液学検査装置 THMS H 6000（テクニコン社、米国）を用いて下記の項目を測定した。

ヘマトクリット値	(HCT)	全赤血球の容積より補正
ヘモグロビン量	(HGB)	シアンメトヘモグロビン法
赤血球数	(RBC)	暗視野板法
平均赤血球容積	(MCV)	RBC, HCTより算出
平均赤血球血色素量	(MCH)	HGB, RBCより算出
平均赤血球血色素濃度	(MCHC)	HGB, HCTより算出
血小板数	(PLT)	暗視野板法
白血球数	(WBC)	暗視野板法
白血球百分率		フローサイトケミストリー法

白血球百分率は上述の機器で測定したが、別途血液塗抹標本を作製し、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色して保管した。

網赤血球（RC）比率の算定については網赤血球染色用ガラス毛细管キャピロット（テルモ株式会社、東京都渋谷区）で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

(5) 血液化学的検査

血液学的検査用の血液と同時期に、腹部大動脈から採血した血液をクリーンシール（株式会社ヤトロン、東京都千代田区）に採取した。検査には、30分間放置後 3,000 r. p. m. 7分間遠心分離して得た血清を用いた。多項目生化学自動分析装置 CentrifChem ENCORE II（ベーカー社、米国）および EKTACHEM 700N（コダック社、米国）を用いて下記の項目を測定した。

総蛋白	(T. protein)	ビュレット法
アルブミン	(Albumin)	B. C. G. 法
A/G	(A/G)	計算値
血糖	(Glucose)	グルコースオキシダーゼ法
尿素窒素	(BUN)	ウレアーゼ改良法
クレアチニン*	(Creatinine)	Jaffé 法
総ビリルビン	(T-Bilirubin)	ジアゾ色素法
グルタミン酸オキザロ酢酸 トランスアミナーゼ*	(GOT)	Karmen改良法

グルタミン酸ピルビン酸 トランスアミナーゼ*	(GPT)	Karmen改良法
γ-グルタミルトランス ペプチダーゼ*	(Gamma-GTP)	Szasz 改法
カリウム	(Potassium)	電極法
塩素	(Chloride)	電極法
カルシウム	(Calcium)	アルセナゾⅢ色素法
無機リン	(I. phosphate)	モリブデン酸アンモニウム法

* 印の項目は ENCORE II で、他は EKTACHEM で測定した。

(6) 剖検および器官重量

以下の該当する動物について剖検し、器官・組織の異常の有無を観察した。

死亡例：

発見後直ちに剖検した。皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巣、精巣上体、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

投与終了時の雄：

剖検時に採血した動物について、放血致死後に器官・組織の肉眼的観察を行い、胸腺、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比（相対重量）を算出した。また、全動物の胸腺、肝臓、腎臓、脳、心臓、脾臓、副腎、精嚢、前立腺、下垂体および異常病変部組織（肺、腹腔内の塊）を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、精巣および精巣上体はブアン氏液で固定した。

(7) 病理組織学検査

固定した下記に該当する器官・組織について、株式会社 組織科学研究所（東京都青梅市）でパラフィン切片を作製し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色した。鏡検は安評センターで実施した。

死亡例：

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巣、精巣上体、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄。

妊娠を成立させた雄：

全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および異常病変部組織。

交尾の成立しなかった雄：

全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺および下垂体。

b. 雌動物

(1) 一般状態の観察

全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で観察した。

(2) 体重測定

全例について、投与0（投与開始日）、7、14および21日に測定し、交尾の成立しなかった雌はそれ以後の投与28、35、42および45日（剖検日）に測定した。交尾成立後は妊娠0、7、14および21日に、分娩後は哺育0および4日に測定した。また、投与期間中の体重増加量を算出した。

(3) 摂餌量の測定

全例について、投与0（投与開始日）、7および14日に、交尾の成立しなかった雌はそれ以降の投与28、35、42および44日（剖検前日）に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出した。交尾成立後は妊娠0、7、14および21日に、分娩後は哺育0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出した。また、投与期間中の累積摂餌量を算出した。

(4) 剖検および器官重量

以下の該当する動物について剖検し、器官・組織の異常の有無を観察した。

死亡例：

発見後、解剖まで冷蔵庫に保管した後剖検した。皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、腔、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

自然分娩した雌：

哺育4日にエーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、胸腺、肝臓、腎臓および卵巣重量を測定し器官重量・体重比（相対重量）を算出した。また、全動物の胸腺、肝臓、腎臓、卵巣、脳、心臓、脾臓、副腎、下垂体および異常病変部組織を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

交尾の成立しなかった雌：

45日間投与後、エーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

死産児のみを娩出した雌および全児死亡の認められた雌：

生存児すべての死亡または喰殺が確認された日にエーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。剖検時に妊娠黄体数および着床痕数を調べた。

(5) 病理組織学検査

固定した下記に該当する器官・組織について、株式会社 組織科学研究所（東京都青梅市）でパラフィン切片を作製し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色した。鏡検は安評センターで実施した。

死亡例：

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄。

交尾の成立しなかった雌：

全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、膣、子宮、卵巣および下垂体。

自然分娩した雌：

全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣および異常病変部組織。

死産児のみを娩出した雌および全児死亡の認められた雌：

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、腔、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄。

c. 親動物の生殖発生に関する観察、検査

(1) 交配

交配前14日間の性周期観察を行った雌を同群内の雄のケージに入れ1対1で最長2週間毎晩同居させた。翌朝、腔垢中の精子確認をもって交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。性周期観察は交尾成立日まで行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した。

交配結果から、各群について交尾率 $[(\text{交尾成立動物数} / \text{同居動物数}) \times 100]$ を算出した。

(2) 自然分娩時および哺育期間中の観察

分娩の確認を妊娠20から25日の午前9時～10時の間に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した場合、その日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩した場合は翌日を哺育0日とした。また、妊娠期間（哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数）、受胎率 $[(\text{受胎動物数} / \text{交尾成立動物数}) \times 100]$ 、出産率 $[(\text{生児出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100]$ 、着床率 $[(\text{着床痕数} / \text{妊娠黄体数}) \times 100]$ 、分娩率 $[(\text{出産児数} / \text{着床痕数}) \times 100]$ 、出生率 $[(\text{出產生児数} / \text{出産児数}) \times 100]$ を算出した。

自然分娩時に分娩状態を観察し、哺育4日まで哺育状態を観察した。哺育4日の剖検時に妊娠黄体数および着床痕数を調べた。

d. 新生児

出産後、出産児数（生存児+死亡児）を調べ、性別を判定し性比（雄/雌）を求めるとともに外形異常の有無を調べた。また、哺育0および4日には雌雄別の同腹児重量を測定し、雌雄別1匹当りの平均重量を算出した。

哺育4日に新生児全例を屠殺し、主要器官の肉眼観察を行った。哺育期間中の死亡児も同様に主要器官の肉眼観察を行った。また、新生児の4日生存率 $[(\text{哺育4日生児数} / \text{出產生児数}) \times 100]$ を算出した。

10) データの記録および統計解析

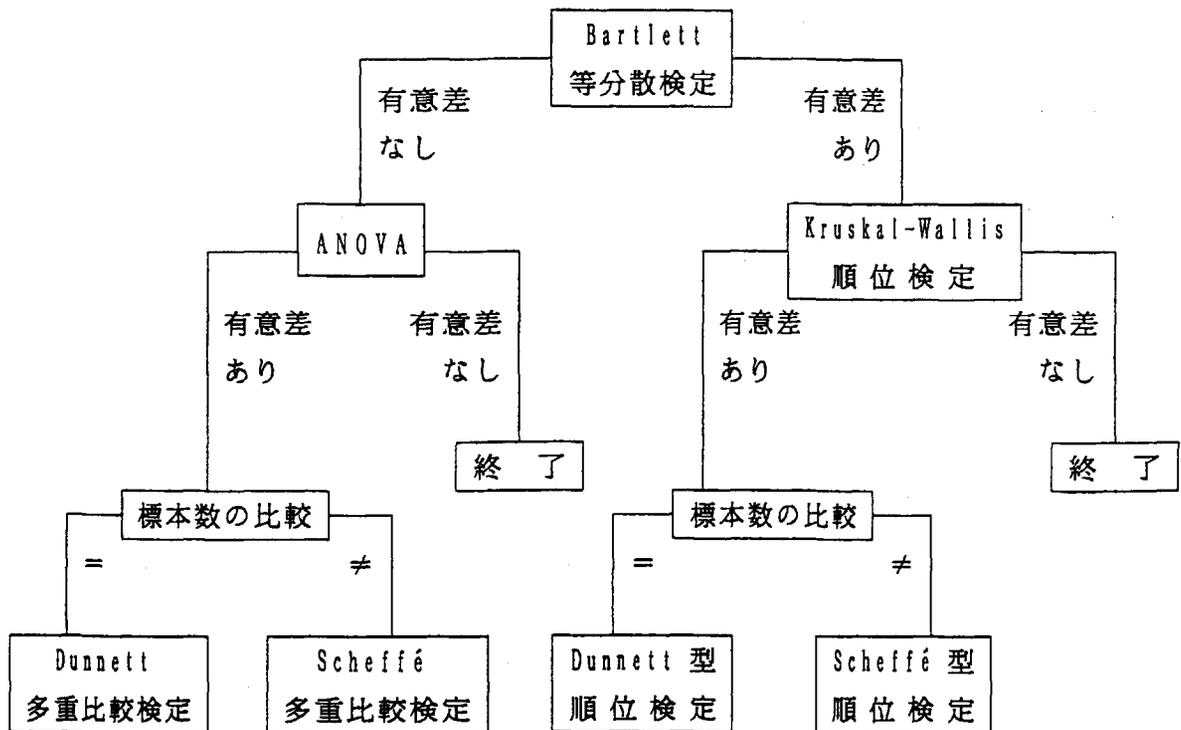
本試験の諸データは、コンピュータ・システムを用いて記録し、試験成績については以下の方法により統計解析を行った。

なお、哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は* : $P < 0.05$ および** : $P < 0.01$ の2段階とした。

体重、摂餌量、妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、死産児数、性比、平均性周期、妊娠期間、着床率、分娩率、出生率、外形異常発現率、新生児の4日生存率、器官重量、器官重量・体重比（相対重量）、血液学的および血液化学的検査値については多重比較検定⁶⁾を用いた。

最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置分散分析を行った。分散が有意で各群の標本数が同数の場合は Dunnett の多重比較検定、各群の標本数が異なる場合は Scheffé の多重比較検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

Bartlett の等分散検定で不等分散の場合は Kruskal-Wallis の順位検定を実施した。有意で各群の標本数が同数の場合は Dunnett の順位検定、各群の標本数が異なる場合は Scheffé の順位検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。



出産率、交尾率および受胎率については X^2 検定^{7, 8)}を用いた。

剖検所見で認められた肝臓の肥大および腎臓の肥大ならびに病理組織学検査で認められた肝臓および腎臓の異常所見については Fisher の直接確率検定法⁸⁾を用いた。

12. 試験結果:

1) 反復投与毒性

a. 雄動物に及ぼす影響

(1) 死亡および一般状態 (Table 1-1 ~ 1-2、Appendix 1-1-1 ~ 1-1-4)

死亡例は、対照群で投与4週に1例観察された。その他の投与群では投与期間を通じ死亡例は観察されなかった。

一般状態の観察では、痂皮(顔面)が対照群で1例、被毛の汚れが(下腹部)200 mg/kg群で7例、眼分泌物が40 および 200 mg/kg群で各1例、流涎が200 mg/kg群で1例に観察された。

(2) 体重 (Figure 1、Table 2-1、Appendix 2-1-1 ~ 2-1-4)

投与期間を通じ対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

(3) 摂餌量 (Figure 3、Table 3-1、Appendix 3-1-1 ~ 3-1-4)

200 mg/kg群で対照群に比べ投与7から14日、28から35日、35から42日および42から44日の平均1日摂餌量が高値を示し、投与21から44日の間の累積摂餌量も高値を示した。8 および 40 mg/kg群では対照群との間に差は認められなかった。

(4) 血液学的検査 (Table 4、Appendix 4)

8 mg/kg以上の投与群で対照群に比べ赤血球数の低値がみられ、さらに40および200 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量低値、網赤血球比率の高値が認められた。200 mg/kg群で血小板数の僅かな高値が認められたが、いずれも対照群の変動の範囲内(平均値 \pm 2 S. D.)であった。その他、8 mg/kg群で好酸球比率の高値、40 mg/kg群で好中球比率の高値およびリンパ球比率の低値が認められたが、いずれも用量に関連した変化ではなかった。

(5) 血液化学的検査 (Table 5、Appendix 5)

40および200 mg/kg群で対照群に比べ総蛋白、アルブミンおよび γ -GTP活性の高値、クレアチニンの低値が認められ、さらに200 mg/kg群でA/Gおよび総ビリルビンの高値が認められた。その他、8 mg/kg群で塩素の高値および無機リンの低値、40 mg/kg群で尿素窒素の僅かな高値、200 mg/kg群で塩素の低値が認められたが、いずれも用量に関連した変化ではなかった。

(6) 器官重量 (Table 6-1、Appendix 6-1-1 ~ 6-2-4)

200 mg/kg群で対照群に比べ肝臓、腎臓の実重量および相対重量がともに高値を示した。8 および 40 mg/kg群では、対照群との間に差は認められなかった。

(7) 剖検所見 (Table 7-1、7-3 ~ 7-4、Appendix 7-1)

死亡例：

死亡例は対照群で1例認められたが、肺の赤色化が観察されたのみであった。

妊娠を成立させた雄：

被験物質投与群に多く観察された所見として、肝臓および腎臓の肥大が200 mg/kg群で4および3例に、肝臓の黄色化が8 mg/kg群で2例に観察された。その他、観察された胸腺の赤色斑／区域、肺の白色斑／区域、肝臓の奇形結節（組織学的には過形成）、腹腔内の塊（組織学的には脂肪壊死）、精巣の萎縮、精巣上体の萎縮および結節は対照群を含め各群で単発性に認められた。

交尾不成立の雄：

対照群および40 mg/kg群で各1例認められた。精巣および精巣上体の萎縮が40 mg/kg群の1例に観察されたのみであった。

(8) 病理組織学検査 (Table 8-1、8-3、8-5、Appendix 8-1)

死亡例：

死亡例は対照群で1例認められた。肺の浮腫およびうっ血が観察された。

妊娠を成立させた雄：

被験物質投与の影響が示唆される所見として、脾臓の中等度の色素沈着 (Photo. 4) が200 mg/kg群で12例中10例に観察された。肝臓では細胞分裂像 (Photo. 3) が8および200 mg/kg群でそれぞれ1および5例に、単細胞壊死が200 mg/kg群で7例に、また、肝細胞腫脹が200 mg/kg群で2例に観察された。腎臓では硝子滴変性が200 mg/kg群で6例に観察された。その他認められた所見は、対照群と被験物質投与群との間で発現数の差はなかった。すなわち、肝臓の脂肪化 (Photo. 3) および細胞浸潤は多数例に、肉芽巣は少数例に観察された。腎臓の尿細管上皮の好塩基性化は多数例に、好酸性小体は一部の例に、リンパ球浸潤は少数例に観察された。また、副腎の空胞化は多数例に観察された。その他の所見は少数例あるいは単発性の発生であった。

交尾不成立の雄：

対照群および40 mg/kg群で各1例認められた。脾臓の中等度の色素沈着、肝臓の細胞浸潤、精巣および精巣上体の萎縮が40 mg/kg群で、前立腺の細胞浸潤が対照群で、また、副腎の空胞化が対照群および40 mg/kg群で観察された。

b. 雌動物に及ぼす影響

(1) 死亡および一般状態 (Table 1-1、1-3 ~ 1-5、Appendix 1-2-1 ~ 1-2-12)

死亡例は、200 mg/kg 群で妊娠23日の分娩中に1例観察された。その他の投与群では投与期間を通じ死亡例は観察されなかった。

一般状態の観察では、被毛の汚れ（下腹部）および歯異常（上顎切歯折れ）が200 mg/kg 群で5（交配および交配期間で4例、妊娠期間で4例）および1例、脱毛（前肢）が対照群で1例に観察された。

(2) 体重 (Figure 2、Table 2-2、Appendix 2-2-1 ~ 2-2-12)

200 mg/kg 群で対照群に比べ妊娠21日に低値を示し、妊娠0から21日の間の体重増加量も低値を示した。8および40 mg/kg 群では対照群との間に差は認められなかった。

(3) 摂餌量 (Figure 4、Table 3-2、Appendix 3-2-1 ~ 3-2-12)

8 mg/kg 群で対照群に比べ投与0から7日、200 mg/kg 群で投与7から14日の平均1日摂餌量が高値を示し、40および200 mg/kg 群で投与0から14日の間の累積摂餌量が高値を示した。妊娠および哺育期間では、対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

(4) 器官重量 (Table 6-2、Appendix 6-3-1 ~ 6-4-4)

200 mg/kg 群で対照群に比べ肝臓の相対重量が高値を示し、実重量も高値傾向を示した。また、同群で対照群に比べ腎臓の実重量および相対重量が高値傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。8および40 mg/kg 群では、対照群との間に差は認められなかった。

(5) 剖検所見 (Table 7-2、7-5 ~ 7-6、Appendix 7-2)

死亡例：

死亡例は200 mg/kg 群で1例認められた。脾臓の褐色化、胸腺の萎縮、肺の赤色化および胃の白色斑／区域が観察された。

哺育4日の雌：

被験物質投与群に多く観察された所見として、胸腺の萎縮が8および40 mg/kg 群で2および1例、肝臓の肥大が200 mg/kg 群で4例、副腎の肥大が40および200 mg/kg 群で2および1例に観察された。その他観察された胸腺の有色斑／区域（褐色）および赤色斑／区域、胃、小腸および大腸の黒色化（内容物）、横隔膜ヘルニア、腎臓の淡明化、卵巣の嚢胞および副腎の有色斑／区域（褐色）は対照群を含め各群で単発性に認められた。

交尾不成立の雌：

対照群および40 mg/kg 群で1例認められたが、異常所見は観察されなかった。

死産児のみを娩出した雌および全児死亡の認められた雌：

死産児のみを娩出した雌および哺育4日までに全児死亡が認められた雌は200 mg/kg群で5例であった。肝臓の肥大が2例、胸腺の萎縮、肺の赤色斑／区域、胃の潰瘍および白色斑／区域、小腸の潰瘍、大腸の白色斑／区域、肝臓の淡明化、腎臓の黒色化および瘢痕、卵巣の嚢胞、副腎の肥大が単発性に観察された。

(6) 病理組織学検査 (Table 8-2、8-4、8-6～8-7、Appendix 8-2)

死亡例：

死亡例は200 mg/kg群で1例認められた。胸腺の萎縮、胃の潰瘍、肝臓の単細胞壊死および乳腺の増生が観察された。

哺育4日の雌：

被験物質投与の影響が示唆される所見として、肝臓の単細胞壊死 (Photo. 1) および肝細胞腫脹が200 mg/kg群でそれぞれ4および5例に観察された。腎臓では好塩基性化が200 mg/kg群で5例に、空胞化が8 mg/kg以上の投与群で2から4例に、細胞分裂像は40および200 mg/kg群でそれぞれ1例に、また、壊死が40および200 mg/kg群でそれぞれ1および2例に観察された。その他認められた所見は、対照群と被験物質投与群との間で発現数の差はなかった。すなわち、肝臓の脂肪化は一部の例に、髄外造血亢進は少数例に観察された。脾臓の色素沈着、造血亢進および胸腺の萎縮は多数例に、副腎の空胞化は少数例に、皮質の増生は多数例に観察された。その他の所見は少数例あるいは単発性の発生であった。

交尾不成立の雌：

対照群および40 mg/kg群で各1例認められた。肝臓の細胞浸潤、腎臓の好塩基性化および子宮の細胞浸潤が40 mg/kg群で、脾臓の中等度の色素沈着が対照群および40 mg/kg群で観察された。

死産児のみを娩出した雌および全児死亡の認められた雌：

200 mg/kg群で5例認められた。脾臓の中等度の色素沈着、胸腺の萎縮および乳腺の増生が全例に観察された。その他、胃、十二指腸および大腸の潰瘍が単発性または少数例に、肝臓では肝細胞腫脹が4例に、変性、壊死および単細胞壊死が単発性に観察された。腎臓では壊死 (Photo. 2)、蛋白様円柱、好塩基性化、硝子滴変性、細胞分裂像、尿細管腔の拡張、空胞化および線維化が単発性または少数例に観察された。また、副腎の硬塞が少数例に観察された。

2) 生殖発生毒性

a. 親動物に及ぼす影響

(1) 交尾および受胎能 (Table 9、Appendix 9-1-1 ~ 9-2-4)

交尾は対照群および 40 mg/kg 群で各 1 組が不成立であり、8 および 200 mg/kg 群は全例成立した。これらの交尾不成立の雌は交配期間を通じ偽妊娠（連続した発情休止期像）が認められ交尾成立まで至らなかった。各群の交尾率は 91.7 ~ 100 % であり、群間差は認められなかった。受胎はすべての群で全例成立した。

性周期観察では、いずれの群もほぼ 4 ~ 5 日の性周期を示し、平均性周期に群間差は認められなかった。200 mg/kg 群で交配前期間に偽妊娠（連続した発情休止期像）が 1 例に認められたが、交配期間中は正常な性周期を示した。

(2) 分娩および哺育 (Table 10、Appendix 10-1 ~ 11-4)

妊娠期間は各群で平均 22.5 ~ 22.7 日の範囲であり、分娩時間の延長も認められなかった。200 mg/kg 群で 9 匹の新生児を娩出し分娩中に死亡した動物が 1 例（動物番号 2310）観察され、剖検時の子宮内検査において子宮内および腔内に残留胎児が 8 匹確認された。また、同群で死産児のみを娩出した動物が 2 例（動物番号 2301、2305）、哺育期間中に全児死亡の認められた動物が 3 例（動物番号 2302、2311、2312）観察され、対照群に比べ出産児数（総出産児数、雌の出産児数）の減少、出生率および雌の生後 4 日生存率の低値、分娩率、雄の出産児数および生後 4 日生存率の低値傾向ならびに死産児数の増加傾向がみられた。対照群、8 および 40 mg/kg 群では、分娩状態の異常は観察されず、黄体数、着床痕数、性比、出産率、着床率、分娩率、出生率および新生児の生後 4 日生存率に群間差は認められなかった。

b. 新生児に及ぼす影響

(1) 外表検査 (Table 11、Appendix 10-1 ~ 10-4)

外傷（腹部）が 8 mg/kg 群で 1 例、皮下出血（後肢、鼻部）が 8 および 200 mg/kg 群で各 1 例に観察されたのみであった。

(2) 体 重 (Table 12、Appendix 12-1-1 ~ 12-2-4)

哺育 4 日までの体重は雌雄ともに群間差は認められなかった。

(3) 剖 検 (Table 13-1 ~ 13-2)

哺育 4 日までの死亡児の剖検では、胸腺の頸部残留が対照群、8 および 200 mg/kg 群で散見されたのみであった。哺育 4 日の生存児の剖検では、胸腺の頸部残留、肝臓の白色斑／区域および腎盂拡大が対照群、8 および 40 mg/kg 群で散見された。

1 2. 考察および結論：

1) 反復投与毒性

死亡例は雄の対照群および雌の 200 mg/kg群で各 1 例観察された。このうち雄は投与 4 週に死亡し、剖検で肺の赤色化、病理組織学検査で肺の浮腫およびうっ血が認められたことから、誤嚥による呼吸不全が死亡の原因と考えられ、被験物質投与による直接的影響ではないと判断した。雌については妊娠 23 日の分娩中に死亡し、病理組織学検査で肝臓の単細胞壊死および胃の潰瘍が観察されていることから、被験物質投与に起因する死亡と考えられた。また、先に実施した 14 日間反復投与による予備試験において、雌の 400 mg/kg群で 6 例中 4 例の死亡が観察されていることから、本試験における 200 mg/kg/day は死亡を惹起する用量と考えられた。一般状態の観察で認められた異常所見はいずれも単発性または少数例の発生であり、程度も軽いことから被験物質投与によるものとは考えられなかった。雌の 200 mg/kg群で妊娠期間中に体重増加抑制が認められたが、雄については投与期間を通じ被験物質投与の影響は認められなかった。

摂餌量において、雄の 200 mg/kg群および雌のすべての被験物質投与群で増加したが、軽度で、かつ体重に一致しない変化であり、背景値と比べて差はないことから、被験物質投与による影響ではないと判断された。

雄の血液学的検査では、8 mg/kg 以上の投与群で赤血球数が低値を 40 および 200 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量が低値を、網赤血球比率が高値を示し、軽微ながら貧血傾向が認められた。

血液化学的検査では、40 および 200 mg/kg群で γ -GTP が高値を、クレアチニンが低値を、さらに 200 mg/kg群で総ビリルビンが高値を示し、肝臓に対する被験物質投与の影響が示唆された。また、40 および 200 mg/kg群で総蛋白およびアルブミンが、さらに 200 mg/kg群で A/G が高値を示した。

器官重量は、雄の 200 mg/kg群で肝臓、腎臓の実重量および相対重量がともに増加し、雌についても同群で肝臓、腎臓の実重量および相対重量が増加または増加傾向を示した。肝臓重量の増加に関連する剖検所見として、雌雄の 200 mg/kg群で肝臓の肥大が、雄の 200 mg/kg群で腎臓の肥大が観察された。その他被験物質投与に起因すると考えられる所見として、胸腺の萎縮または副腎の肥大が雌の被験物質投与群で観察された。肝臓の黄色化が雄の 8 mg/kg群で 2 例に観察されたが被験物質投与との関連は明らかでなかった。

組織学的には、肝臓に肝細胞腫脹および単細胞壊死が観察された。核分裂像は雄の 200 mg/kg群に多く観察され、これらの所見は剖検所見で指摘された肝臓の肥大を裏付ける変化と考えられた。腎臓では、雄に尿細管上皮の硝子滴変性、雌に好塩基性化がいずれも 200 mg/kg群にやや多く観察された。肝臓および腎臓に観察されたこれらの病変はいずれも被験物質投与に起因するものと考えられた。さらに雌では少数例ではあるが、尿細管上皮の壊死が 40 および 200 mg/kg群にそれぞれ 1 および 2 例観察され、細胞分裂を伴うものであった。また、空胞化は 8 mg/kg以上の投与群に観察されており、被験物質投与の影響に性差のあることが示唆され、雌では妊娠状態における要因も関与していることが考え

られる。200 mg/kg 群において死産児のみを娩出した雌および全児死亡の認められた雌では、脾臓の中等度の色素沈着、胸腺の萎縮、肝細胞腫脹が4～5例に、胃、十二指腸および大腸の潰瘍、肝臓の変性・壊死および単細胞壊死、腎臓の尿細管上皮の壊死、好塩基性化、蛋白様円柱、硝子滴変性、細胞分裂像、尿細管腔の拡張、空胞化および線維化など多彩な病変が少数例に観察された。いずれも被験物質投与の影響に加え、妊娠の関与が示唆された。

なお、類似物質であるニトロベンゼンやジニトロベンゼンにおいて、精細管上皮のセルトリ細胞に直接障害を及ぼすことが報告されているため、対照群の10例および200 mg/kg群の12例について精巣のHEおよびPAS染色標本を作製し、ステージⅧの精細管の精上皮細胞数を測定した(Reference data 7)。その結果、精祖細胞、プレレプトテ期精母細胞、パキテ期精母細胞、ステップ8精子細胞およびセルトリ細胞数は対照群と比較して差はなく、精巣毒性は認められなかった。

以上のことから、2,4-ジクロロニトロベンゼンの反復投与により、雌の200 mg/kg群で体重増加抑制が、40および200 mg/kg群で貧血傾向、総蛋白、アルブミンおよび γ -GTPの高値およびクレアチニンの低値、さらに200 mg/kg群で総ビリルビンおよびA/Gの高値、肝臓および腎臓重量の増加、肝臓または腎臓の肥大が認められた。病理組織学検査では、肝臓および腎臓を中心とした異常所見が認められ、本剤における標的器官は肝臓および腎臓と考えられた。従って、無影響量は雌雄ともに8 mg/kg/day未満と推察される。

2) 生殖発生毒性

交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められず、性周期についても、すべての投与群でほぼ4～5日の周期を示し、被験物質投与の影響は認められなかった。交尾不成立の動物は対照群および40 mg/kg群で雌雄各1例観察され、剖検の結果、40 mg/kg群の雄1例に精巣および精巣上体の萎縮が認められた。本所見は交尾不成立の原因に関連すると考えられるが、被験物質投与との関連は明らかでなかった。

分娩時観察では、200 mg/kg群で一部の新生児を娩出した後に死亡した動物が1例観察された。また、200 mg/kg群で死産児のみを娩出した動物が2例および哺育期間中に全児死亡の認められた動物が3例観察され、出産児数の減少、出生率、新生児の生後4日生存率および分娩率の低値または低値傾向ならび死産児数の増加傾向が認められたことから、分娩あるいは哺育機能の障害を惹起する可能性が示唆された。なお、妊娠期間および分娩時間では被験物質投与による影響は認められなかった。

新生児の外表検査で認められた異常はいずれも単発性であり、自然発生性の所見と考えられた。また、新生児の体重も哺育4日まで順調に増加し、死産児、死亡児および哺育4日の剖検でも被験物質投与による影響は認められなかった。

以上のことから、2,4-ジクロロニトロベンゼンによる雄の生殖に及ぼす影響は、200 mg/kg/day 投与によっても認められず、無影響量は 200 mg/kg/day と推察される。雌の生殖に及ぼす影響および児動物の発生・発育に及ぼす影響は、200 mg/kg 群で死産児のみを娩出した雌および哺育期間中の全児死亡が認められたことから、無影響量は 40 mg/kg/day と推察される。

14. 参 考 文 献 :

- 1) Critical Reviews in Toxicology, Vol. 11, CRC Press (1983).
- 2) T. E. Cody, S. *et al.* : 1,3-Dinitrobenzene: Toxic effects *in vivo* and *in vitro* , J. Toxicol. Environ. Health, 7, 829-847 (1981).
- 3) J. A. Bond, *et al.* : Induction of hepatic and testicular lesions in Fischer-344 rats by single oral doses of nitrobenzene, Fundam. Appl. Toxicol., 1, 389-394 (1981).
- 4) T. T. McLaren, *et al.* : Effect of age on seminiferous tubule protein secretion and the adverse effects of testicular toxicants in the rat, Int. J. Andr., 16, 370-379 (1993).
- 5) OECD guideline for testing of chemicals: Extended Steering Group Document, No. 3 (1990).
- 6) Shayne, C. G. and Carrol, S. W. : Statics and Experimental Design For Toxicologists, Telford Press (1986).
- 7) 佐久間昭 : 薬効評価 I - 計画と解析 -, 東京大学出版会 (1977) 。
- 8) 石居 進 : 生物統計学入門、培風館 (1975) 。

Figures, Tables

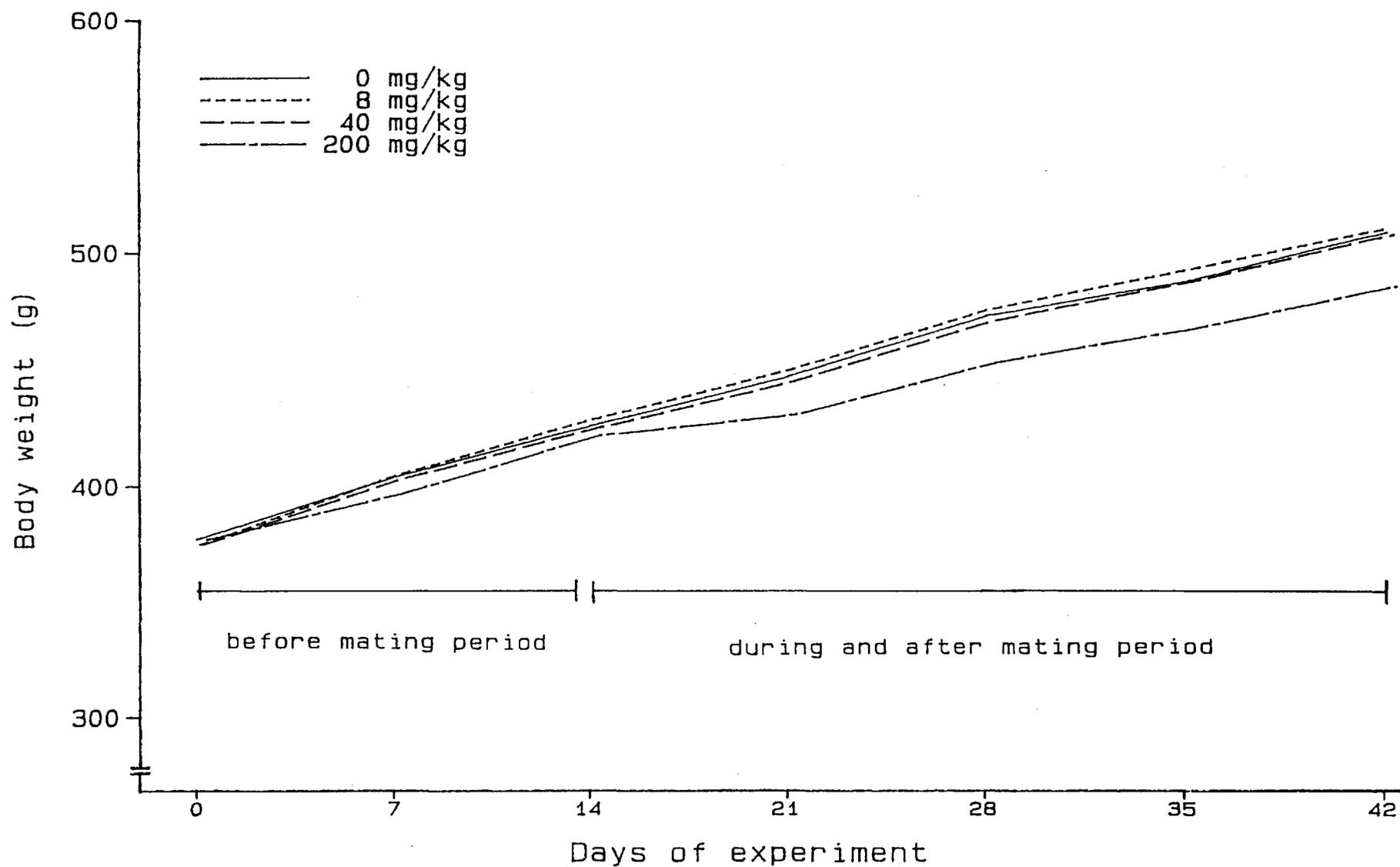


Figure 1
Body weight change of male rats

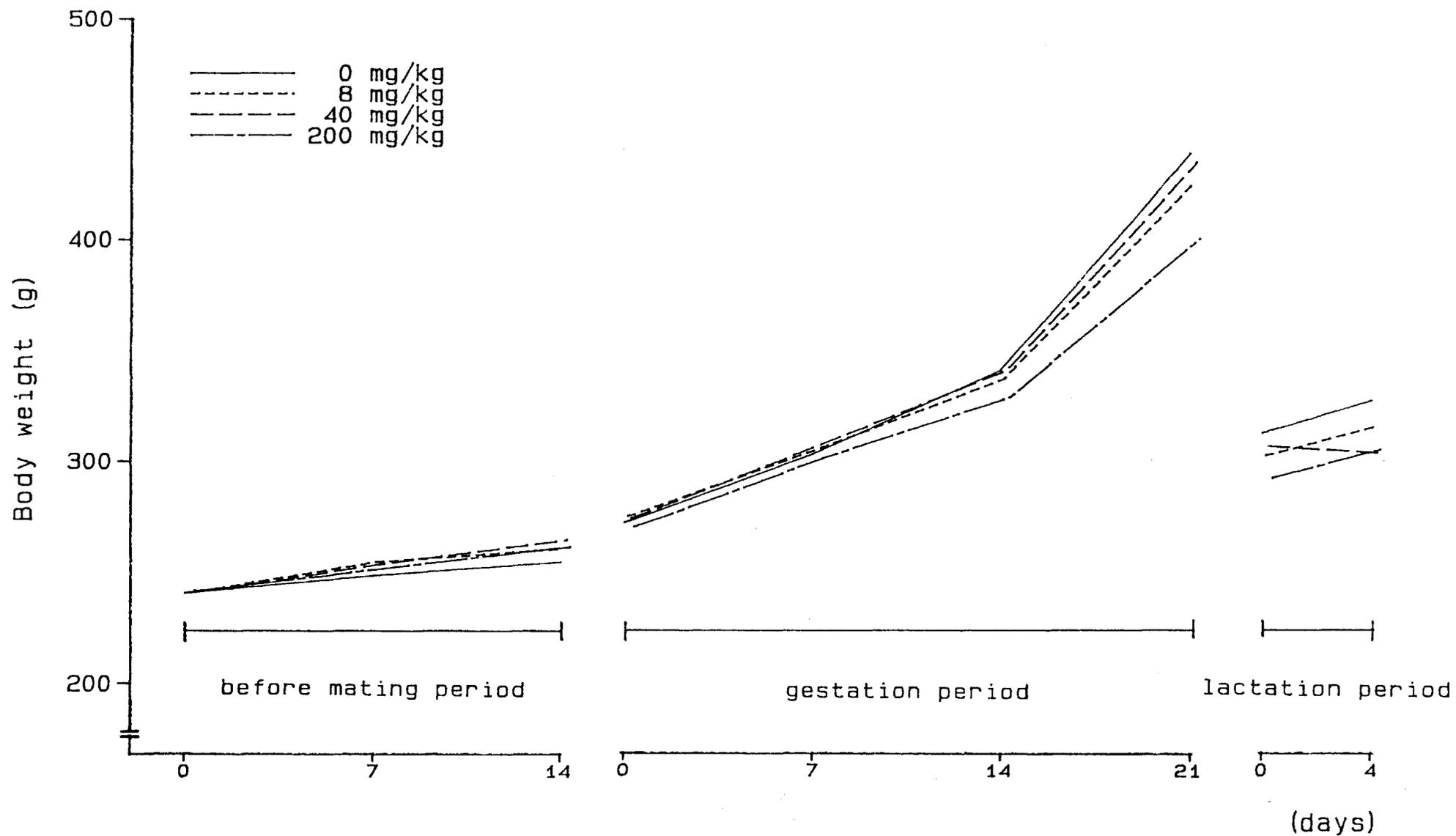


Figure 2
Body weight change of female rats

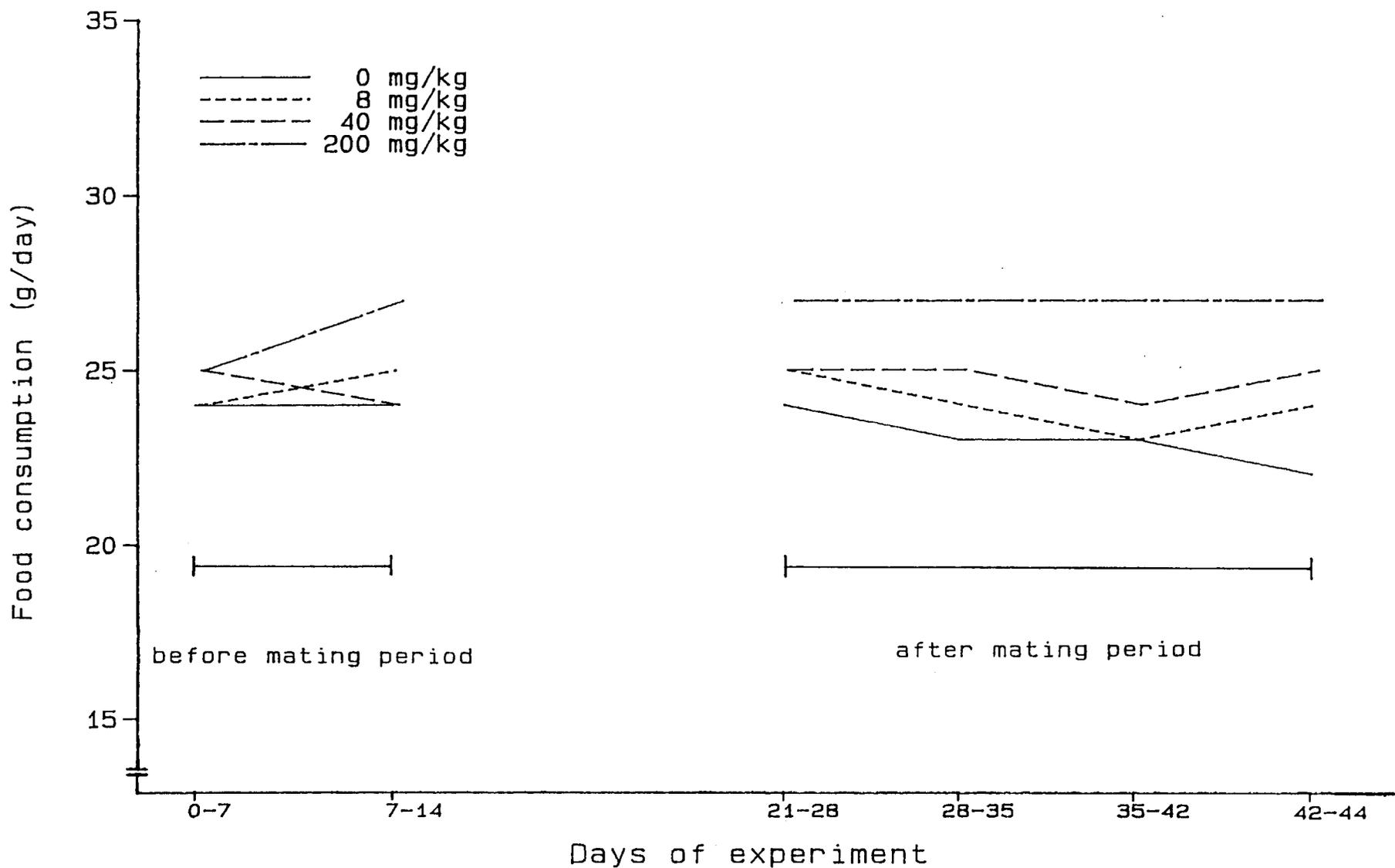


Figure 3
Food consumption of male rats

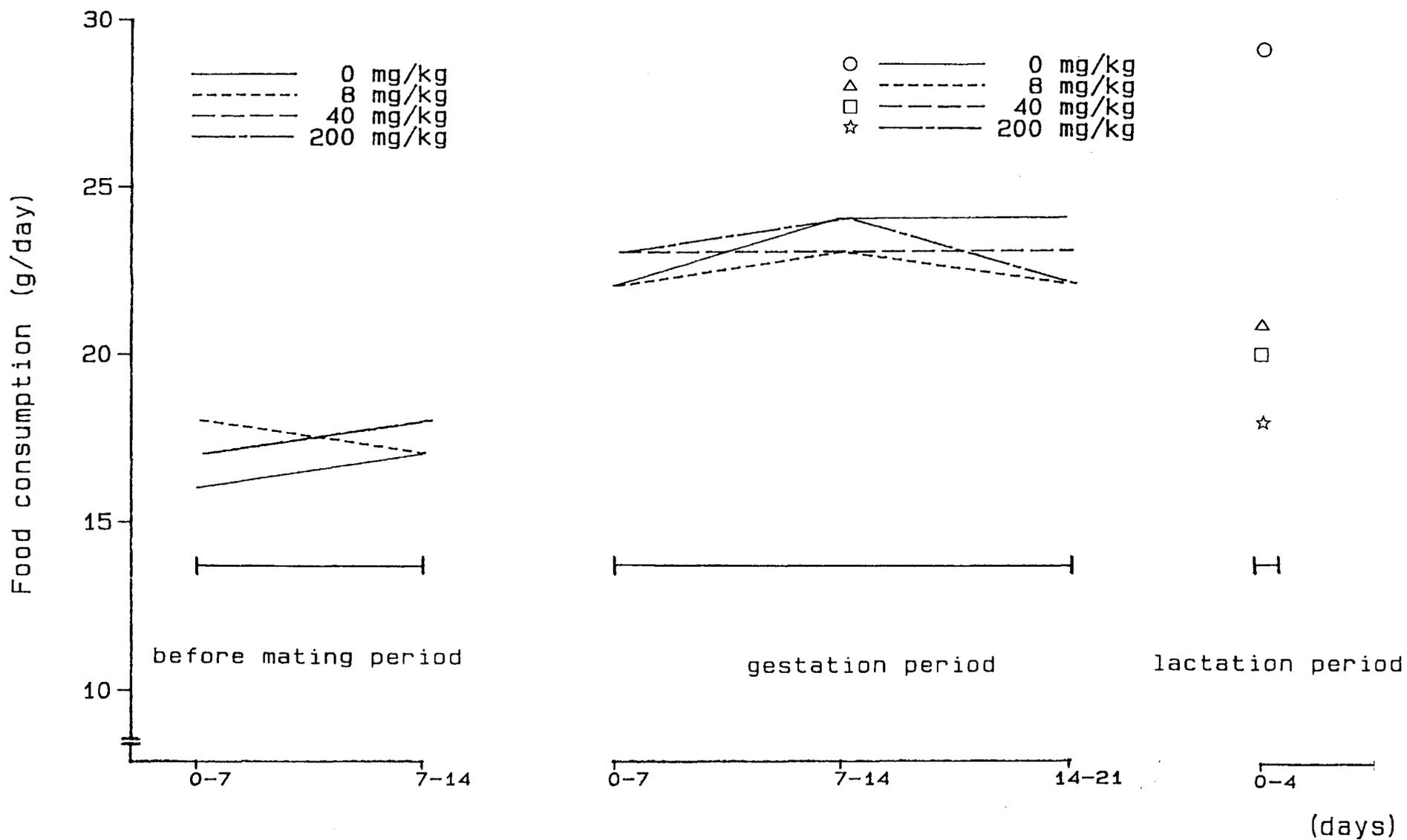


Figure 4
Food consumption of female rats

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment							Total (0-45)
		0- 6	7-13	14-20	21-27	28-34	35-41	42-45	
number per group	0	12	12	12	12	11	11	11	
	8	12	12	12	12	12	12	12	
	40	12	12	12	12	12	12	12	
	200	12	12	12	12	12	12	12	
sacrificed	0	0	0	0	0	0	0	11	11
	8	0	0	0	0	0	0	12	12
	40	0	0	0	0	0	0	12	12
	200	0	0	0	0	0	0	12	12
dead	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0	0
normal	0	12	12	12	10	10	11	11	10
	8	12	12	12	12	12	12	12	12
	40	12	11	12	12	12	12	12	11
	200	12	12	6	5	11	12	12	4
crust	0	0	0	0	1	1	0	0 a)	1 b)
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0	0
dirty hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	6	6	0	0	0	7
discharge of eye	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	1	0	0	0	0	0	1
	200	0	0	0	1	0	0	0	1
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	1	0	0	1

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

Table 1-3

Clinical observations on female rats
(Before and during mating period)

Exp. No. 2282(115-025)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment							Total (0-45)
		0- 6	7-13	14-20	21-27	28-34	35-41	42-45	
number per group	0	12	12	12	1	1	1	1	
	8	12	12	12	0	0	0	0	
	40	12	12	12	1	1	1	1	
	200	12	12	12	0	0	0	0	
sacrificed	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	1	1
	200	0	0	0	0	0	0	0	0
copulation	0	0	0	11	0	0	0	0	11
	8	0	0	12	0	0	0	0	12
	40	0	0	11	0	0	0	0	11
	200	0	0	12	0	0	0	0	12
normal	0	12	12	12	1	1	1	1	12
	8	12	12	12	0	0	0	0	12
	40	12	12	12	1	1	1	1	12
	200	12	12	8	0	0	0	0	8
dirty hair	0	0	0	0	0	0	0	0 a)	0 b)
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	4	0	0	0	0	4

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

Table 1-4

Clinical observations on female rats
(Gestation period)

Exp. No. 2282(115-025)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
number per group	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	8	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	40	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	200	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
delivery	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
normal	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	8	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	40	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	200	9	9	9	8	8	8	10	10	11	12	12	12	12	12
dirty hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 a)	0 b)
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	3	3	3	4	4	4	2	2	1	0	0	0	0	0
teeth abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

Table 1-4 -Continued

Clinical observations on female rats
(Gestation period)

Exp. No. 2282(115-025)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation										Total (0-23)	
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
number per group	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	8	
	8	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	
	40	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	6	
	200	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	
dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
delivery	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	8	11	
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	5	7	12	
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	11	
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	3	8	11	
normal	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	8	11	
	8	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	12	
	40	11	11	11	11	11	11	11	11	11	6	11	
	200	11	11	12	12	12	12	12	12	12	8	7	
dirty hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 a)	0 b)	
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
teeth abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	200	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

Table 1-5

Clinical observations on female rats
(Lactation period)

Exp. No. 2282(115-025)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of lactation					Total (0-4)
		0	1	2	3	4	
number per group	0	11	11	11	11	11	
	8	12	12	12	12	12	
	40	11	11	11	11	11	
	200	11	7	6	6	6	
sacrificed	0	0	0	0	0	11	11
	8	0	0	0	0	12	12
	40	0	0	0	0	11	11
	200	0	0	0	0	6	6
sacrificed (all pups died)	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0
	200	4	1	0	0	0	5

normal	0	11	11	11	10	10	10
	8	12	12	12	12	12	12
	40	11	11	11	11	11	11
	200	11	7	6	6	6	11
loss of hair	0	0	0	0	1	1 a)	1 b)
	8	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

Table 2-1

Body weight change of male rats

No. 2282(115-025)

		Unit : g			
Dose level		0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
No. of animals		12	12	12	12
Days of experiment	0	377 ± 12.8	375 ± 15.3	375 ± 15.7	377 ± 14.9
	7	404 ± 21.0	405 ± 16.4	403 ± 23.1	397 ± 16.6
	14	426 ± 24.2	429 ± 18.3	425 ± 30.5	422 ± 21.8
	21	447 ± 30.4	450 ± 17.3	445 ± 31.5	431 ± 21.4
	28	473 ± 35.3 (11)	476 ± 16.5	471 ± 32.7	453 ± 27.1
	35	488 ± 37.0 (11)	493 ± 17.3	488 ± 37.0	468 ± 29.8
	42	509 ± 37.3 (11)	511 ± 24.5	508 ± 40.5	486 ± 34.2
Gain	0-42	130 ± 28.1 (11)	136 ± 24.0	133 ± 30.7	110 ± 29.7

Values are expressed as Mean±S.D.

Values in parentheses are expressed number of animals measured

Table 2-2

Body weight change of female rats

Exp. No. 2282(115-025)

					Unit : g
Dose level		0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
Before mating period					
No. of animals		12	12	12	12
Days of experiment	0	241 ± 7.2	241 ± 7.7	241 ± 8.1	242 ± 7.1
	7	249 ± 9.2	255 ± 8.8	254 ± 11.6	252 ± 9.5
	14	255 ± 9.3	261 ± 9.6	265 ± 14.4	262 ± 11.1
	Gain 0-14	14 ± 9.5	20 ± 7.6	24 ± 8.6	20 ± 9.3
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
Gestation period					
No. of dams		11	12	11	12
Days of gestation	0	272 ± 9.9	275 ± 11.4	274 ± 14.6	270 ± 12.8
	7	303 ± 11.7	305 ± 12.4	307 ± 15.5	301 ± 14.8
	14	341 ± 15.8	337 ± 17.2	341 ± 17.0	329 ± 14.9
	21	438 ± 25.3	425 ± 20.3	434 ± 24.9	400 ± 33.7 *
	Gain 0-21	166 ± 23.3	150 ± 16.4	161 ± 20.8	130 ± 29.8 **
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
Lactation period					
No. of dams		11	12	11	11
Days of lactation	0	312 ± 28.5	302 ± 26.4	306 ± 22.1	292 ± 23.8
	4	327 ± 29.3	315 ± 26.7	303 ± 39.5	305 ± 41.8 (6)
	Gain 0-4	15 ± 20.9	14 ± 18.6	-2 ± 27.6	2 ± 24.1 (6)

Values are expressed as Mean±S.D.

Values in parentheses are expressed number of animals measured

Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

Table 3-1

Food consumption of male rats

Exp. No. 2282(115-025)

		Unit : g/day			
Dose level		0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
No. of animals		12	12	12	12
Days of experiment	0- 7	24 ± 1.9	24 ± 2.2	25 ± 2.9	25 ± 3.0
	7-14	24 ± 1.6N	25 ± 1.8	24 ± 3.1	27 ± 3.3 *
	21-28	24 ± 2.9N(10)	25 ± 2.0	25 ± 1.7 (11)	27 ± 3.9
	28-35	23 ± 2.6 (11)	24 ± 1.9	25 ± 3.0	27 ± 3.1 **
	35-42	23 ± 1.9 (11)	23 ± 2.5	24 ± 2.6	27 ± 3.1 *
	42-44	22 ± 2.5 (11)	24 ± 2.5	25 ± 1.6	27 ± 3.5 **
Cumulative consumption	0-14	333 ± 23.5	344 ± 24.2	343 ± 39.7	366 ± 42.4
	21-44	541 ± 50.2 (10)	556 ± 46.0	571 ± 46.9 (11)	626 ± 71.5 **

Values are expressed as Mean±S.D.

Values in parentheses are expressed number of animals measured

Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

N : Non parametric analysis

Table 3-2

Food consumption of female rats

Exp. No. 2282(115-025)

Dose level		Unit : g/day			
		0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
Before mating period					
No. of animals		12	12	12	12
Days of experiment	0- 7	16 ± 1.0	18 ± 1.2 *	17 ± 1.8	17 ± 1.7
	7-14	17 ± 1.2	17 ± 0.8	18 ± 1.6	18 ± 1.7 **
Cumulative consumption	0-14	229 ± 9.8N	242 ± 10.9	247 ± 22.6 *	246 ± 18.8 *

Gestation period					
No. of dams		11	12	11	12
Days of gestation	0- 7	22 ± 2.8	22 ± 2.3	23 ± 2.9	23 ± 2.2
	7-14	24 ± 2.9	23 ± 2.5	23 ± 2.3	24 ± 2.8
	14-21	24 ± 2.9	22 ± 2.0	23 ± 2.6	22 ± 4.0
Cumulative consumption	0-21	489 ± 52.7	476 ± 34.2	482 ± 50.1	478 ± 52.9

Lactation period					
No. of dams		11	12	11	6
Days of lactation	0- 4	29 ± 7.9	21 ± 10.7	20 ± 11.9	18 ± 9.7

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

N : Non parametric analysis

Table 4

Hematology of male rats

Exp. No. 2282(115-025)

Day: 45

Dose level	0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
No. of animals	11	12	12	12
HCT (%)	44.6 ± 1.3	43.8 ± 1.3	42.2 ± 1.1 **	40.2 ± 0.9 **
HGB (g/dl)	14.4 ± 0.4	14.2 ± 0.4	13.8 ± 0.3 **	13.0 ± 0.3 **
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	7.98 ± 0.24	7.79 ± 0.29 *	7.44 ± 0.18 **	7.19 ± 0.20 **
MCV (μm ³)	55.9 ± 1.8	56.4 ± 1.9	56.8 ± 1.9	55.9 ± 2.1
MCH (pg)	18.1 ± 0.5	18.3 ± 0.5	18.5 ± 0.5	18.1 ± 0.6
MCHC (%)	32.4 ± 0.3	32.4 ± 0.4	32.6 ± 0.4	32.3 ± 0.4
PLT (x10 ³ /mm ³)	973 ± 104	979 ± 64	987 ± 85	1070 ± 87 *
WBC (x10 ³ /mm ³)	10.5 ± 1.6	9.3 ± 2.0	9.6 ± 2.3	12.0 ± 2.7
Differential leukocyte counts (%)				
NEUT	18 ± 4	20 ± 4	21 ± 4 *	16 ± 2
LYMPH	80 ± 4	77 ± 4	77 ± 4 *	82 ± 3
MONO	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
EOSN	1 ± 0N	2 ± 1 *	1 ± 1	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reticulocyte (‰)	28 ± 12	30 ± 20	45 ± 17 *	62 ± 19 **

NEUT : Neutrophil LYMPH : Lymphocyte MONO : Monocyte EOSN : Eosinophil BASO : Basophil

LUC : Large unstained cells

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

N : Non parametric analysis

Day: 45

Dose level	0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
No. of animals	11	12	12	12
T.protein(g/dl)	5.69 ± 0.20	5.72 ± 0.19	5.88 ± 0.15 **	6.09 ± 0.09 **
Albumin(g/dl)	3.26 ± 0.14	3.29 ± 0.09	3.41 ± 0.11 **	3.57 ± 0.08 **
A/G	1.35 ± 0.07	1.36 ± 0.07	1.38 ± 0.06	1.42 ± 0.07 *
Glucose(mg/dl)	157 ± 18	145 ± 13	155 ± 15	144 ± 19
BUN(mg/dl)	11.8 ± 1.6	13.0 ± 1.7	13.3 ± 1.5 *	10.9 ± 1.2
Creatinine(mg/dl)	0.69 ± 0.03	0.65 ± 0.06	0.61 ± 0.05 **	0.61 ± 0.06 **
T.bilirubin(mg/dl)	0.14 ± 0.04N	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.27 ± 0.05 **
GOT(U/l)	40 ± 5	42 ± 5	47 ± 8	44 ± 9
GPT(U/l)	16 ± 3	16 ± 3	17 ± 2	18 ± 3
Gamma-GTP(U/l)	0.0 ± 0.1N	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3 *	0.6 ± 0.5 **
Potassium(mmol/l)	4.44 ± 0.29	4.50 ± 0.28	4.44 ± 0.25	4.42 ± 0.31
Chloride(mmol/l)	107.2 ± 0.8	108.3 ± 1.4 *	106.2 ± 1.1	104.1 ± 1.2 **
Calcium(mg/dl)	10.31 ± 0.24N	10.52 ± 0.64	10.16 ± 0.30	10.50 ± 0.51
I.phosphate(mg/dl)	6.18 ± 0.35	5.67 ± 0.30 **	5.92 ± 0.50	6.09 ± 0.48

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

N : Non parametric analysis

Table 6-1

Absolute and relative organ weight of male rats

Exp. No. 2282(115-025)

Dose level		0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
No. of animals examined		11	12	12	12
Body weight	(g)	489 ± 38	494 ± 23	490 ± 36	460 ± 32
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	278 ± 76	308 ± 91	299 ± 52	269 ± 55
Liver	(g)	14.38 ± 1.96	14.54 ± 1.36	15.14 ± 1.70	18.40 ± 1.87 **
Kidneys	(g)	3.04 ± 0.25	3.24 ± 0.31	3.32 ± 0.25	3.47 ± 0.27 **
Testes	(g)	3.58 ± 0.59N	3.48 ± 0.32	3.21 ± 0.79	3.47 ± 0.23
Epididymides	(g)	1.35 ± 0.19	1.34 ± 0.13	1.24 ± 0.26	1.35 ± 0.15
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	56.555 ± 13.095	62.620 ± 19.331	60.993 ± 9.511	58.638 ± 12.090
Liver	(g%)	2.929 ± 0.210	2.942 ± 0.193	3.088 ± 0.183	3.994 ± 0.223 **
Kidneys	(g%)	0.622 ± 0.041	0.657 ± 0.049	0.681 ± 0.061	0.755 ± 0.043 **
Testes	(g%)	0.736 ± 0.156N	0.707 ± 0.080	0.656 ± 0.158	0.757 ± 0.073
Epididymides	(g%)	0.276 ± 0.043	0.272 ± 0.033	0.253 ± 0.055	0.295 ± 0.032

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; **: P<0.01

N : Non parametric analysis

Table 6-2

Absolute and relative organ weight of female rats

Exp. No. 2282(115-025)

Dose level		0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
No. of animals examined		11	12	11	6
Body weight	(g)	327 ± 29	315 ± 27	303 ± 39	305 ± 42
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	190 ± 101	127 ± 68	145 ± 88	172 ± 91
Liver	(g)	13.45 ± 1.53N	13.03 ± 1.10	12.48 ± 2.66	15.90 ± 1.00
Kidneys	(g)	2.11 ± 0.14	2.08 ± 0.14	2.14 ± 0.20	2.28 ± 0.20
Ovaries	(mg)	103 ± 10	110 ± 13	104 ± 17	101 ± 11
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	56.831 ± 28.062	39.262 ± 18.054	45.552 ± 23.631	54.439 ± 24.865
Liver	(g%)	4.125 ± 0.447	4.144 ± 0.320	4.080 ± 0.537	5.276 ± 0.518 **
Kidneys	(g%)	0.647 ± 0.046N	0.663 ± 0.049	0.717 ± 0.116	0.764 ± 0.156
Ovaries	(mg%)	31.572 ± 2.789N	35.146 ± 5.151	35.266 ± 8.783	34.124 ± 9.095

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; **: P<0.01

N : Non parametric analysis

Table 7-1. Summary of gross findings (successful pregnancy)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	8	40	200
No. of animals necropsied	10	12	11	12
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
thymus red patch/zone	0	0	1	0
RESPIRATORY SYSTEM				
lung white patch/zone	0	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM				
liver enlarged	0	0	0	4
malformative nodule	0	0	0	1
yellowish	0	2	0	0
abdominal cavity mass	1	0	0	0
URINARY SYSTEM				
kidney enlarged	0	0	0	3
REPRODUCTIVE SYSTEM				
testis atrophic	1	0	0	0
epididymis atrophic	1	0	0	0
nodule	0	0	0	1

Values are expressed number of animals with gross lesion.

Table 7-2. Summary of gross findings (day 4 of lactation)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	8	40	200
No. of animals necropsied	11	12	11	6
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
thymus atrophic	0	2	1	0
colored patch/zone	1	0	0	0
red patch/zone	0	0	1	0
DIGESTIVE SYSTEM				
stomach black	0	0	0	1
small intestine black	0	0	0	1
large intestine black	0	0	0	1
liver diaphragmatic hernia	0	0	1	0
enlarged	0	0	0	4**
URINARY SYSTEM				
kidney pale	0	0	1	0
REPRODUCTIVE SYSTEM				
ovary cyst	0	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM				
adrenal gland colored patch/zone	0	1	0	0
enlarged	0	0	2	1

Values are expressed number of animals with gross lesion.
Significantly different from control group; **: P<0.01

Table 7-3. Summary of gross findings (not copulation)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	8	40	200
No. of animals necropsied	1	0	1	0
Organ _____ Findings _____				
REPRODUCTIVE SYSTEM				
testis atrophic	0	-	1	-
epididymis atrophic	0	-	1	-

Values are expressed number of animals with gross lesion.

Table 7-4. Summary of gross findings (dead)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	8	40	200
No. of animals necropsied	1	0	0	0
Organ Findings				
RESPIRATORY SYSTEM				
lung reddish	1	-	-	-
DIGESTIVE SYSTEM				
small intestine autolysis	1	-	-	-

Values are expressed number of animals with gross lesion.

Table 7-5. Summary of gross findings (all pups died)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	8	40	200
No. of animals necropsied	0	0	0	5
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
thymus atrophic	-	-	-	1
RESPIRATORY SYSTEM				
lung red patch/zone	-	-	-	1
DIGESTIVE SYSTEM				
stomach ulcer	-	-	-	1
stomach white patch/zone	-	-	-	1
small intestine ulcer	-	-	-	1
large intestine white patch/zone	-	-	-	1
liver enlarged	-	-	-	2
liver pale	-	-	-	1
URINARY SYSTEM				
kidney black	-	-	-	1
kidney scarred	-	-	-	1
REPRODUCTIVE SYSTEM				
ovary cyst	-	-	-	1
ENDOCRINE SYSTEM				
adrenal gland enlarged	-	-	-	1

Values are expressed number of animals with gross lesion.

Table 7-6. Summary of gross findings (dead)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	8	40	200
No. of animals necropsied	0	0	0	1
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen brown	-	-	-	1
thymus atrophic	-	-	-	1
RESPIRATORY SYSTEM				
lung reddish	-	-	-	1
DIGESTIVE SYSTEM				
stomach white patch/zone	-	-	-	1
small intestine autolysis	-	-	-	1
large intestine autolysis	-	-	-	1
URINARY SYSTEM				
kidney autolysis	-	-	-	1
NERVOUS SYSTEM				
brain autolysis	-	-	-	1

Values are expressed number of animals with gross lesion.

Table 8-1. Summary of histological findings (successful pregnancy)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				8				40				200							
No. of animals sacrificed	10				12				11				12							
No. of animals necropsied	10				12				11				12							
No. of animals examined histologically	10				12				11				12							
Organ	Findings				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3			
CARDIOVASCULAR SYSTEM																				
heart	(10)				(12)				(11)				(12)							
granulation	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0				
HEMATOPOIETIC SYSTEM																				
spleen	(10)				(12)				(11)				(12)							
deposit of pigment	-	10	0	0	-	10	2	0	-	9	1	0	-	2	10	0				
thymus	(10)				(12)				(11)				(12)							
hemorrhage	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0				
RESPIRATORY SYSTEM																				
lung	(0)				(1)				(0)				(0)							
interstitial cell hyperplasia	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-				
DIGESTIVE SYSTEM																				
liver	(10)				(12)				(11)				(12)							
fatty change	-	7	0	0	-	8	1	0	-	5	0	0	-	9	1	0				
mitosis	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	5	0	0*				
single cell necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	7	0	0**				
swelling of liver cells	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0				
granulation	-	0	0	0	-	2	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0				
infiltration/cellular	-	4	0	0	-	7	0	0	-	5	0	0	-	7	0	0				
lymphocytic infiltration	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0				
bile duct hyperplasia	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0				
hepatodiaphragmatic nodule	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0				
abdominal cavity	(1)				(0)				(0)				(0)							
fat necrosis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
URINARY SYSTEM																				
kidney	(10)				(12)				(11)				(12)							
basophilic change	-	9	0	0	-	9	0	0	-	7	0	0	-	10	1	0				
cyst	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0				
deposit of calcium	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0				
eosinophilic body	-	1	0	0	-	6	0	0	-	0	0	0	-	4	0	0				
hyaline droplet	-	1	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	6	0	0				
protein cast	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0				
tubular dilatation	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0				
lymphocytic infiltration	-	1	0	0	-	1	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0				

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
 =: benign #: malignant
 Values are expressed number of animals with micro lesion.
 (): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.
 Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

Table 8-1. -continued Summary of histological findings (successful pregnancy)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				8				40				200							
No. of animals sacrificed	10				12				11				12							
No. of animals necropsied	10				12				11				12							
No. of animals examined histologically	10				12				11				12							
Organ	Findings				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3			
REPRODUCTIVE SYSTEM																				
testis	(10)				(12)				(11)				(12)							
atrophy	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0				
giant cell	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0				
epididymis	(1)				(0)				(0)				(1)							
atrophy	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
ENDOCRINE SYSTEM																				
adrenal gland	(10)				(12)				(11)				(12)							
vacuolic change	-	7	0	0	-	12	0	0	-	11	0	0	-	10	0	0				

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

-: Not applicable.

Table 8-2. Summary of histological findings (day 4 of lactation)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				8				40				200							
No. of animals sacrificed	11				12				11				6							
No. of animals necropsied	11				12				11				6							
No. of animals examined histologically	11				12				11				6							
Organ	Findings				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3			
HEMATOPOIETIC SYSTEM																				
spleen	(11)				(12)				(11)				(6)							
deposit of pigment	-	11	0	0	-	11	1	0	-	11	0	0	-	5	1	0				
hematopoiesis, increased	-	7	2	0	-	7	1	0	-	6	1	0	-	4	0	0				
thymus	(11)				(12)				(11)				(6)							
hemorrhage	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0				
atrophy	-	5	0	0	-	6	0	2	-	6	1	0	-	2	0	0				
DIGESTIVE SYSTEM																				
stomach	(0)				(0)				(0)				(1)							
edema	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
infiltration/cellular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
squamous cell hyperplasia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
liver	(11)				(12)				(11)				(6)							
fatty change	-	2	0	0	-	2	0	0	-	2	2	0	-	1	0	0				
mitosis	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0				
necrosis	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0				
single cell necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	4	0	0**				
swelling of liver cells	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	5	0	0**				
granulation	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0				
extramedullary hematopoiesis	-	3	0	0	-	1	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0				
hepatodiaphragmatic nodule	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0				
URINARY SYSTEM																				
kidney	(11)				(12)				(11)				(6)							
basophilic change	-	1	0	0	-	2	0	0	-	1	0	0	-	5	0	0**				
cyst	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0				
deposit of calcium	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0				
fatty change	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0				
mitosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0				
necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	2	0	0				
tubular dilatation	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0				
vacuolic change	-	0	0	0	-	4	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0				
REPRODUCTIVE SYSTEM																				
ovary	(11)				(12)				(11)				(6)							
cyst	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0				
deposit of pigment	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0				

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Significantly different from control group; **: P<0.01

-: Not applicable.

Table 8-2. -continued Summary of histological findings (day 4 of lactation)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				8				40				200			
No. of animals sacrificed	11				12				11				6			
No. of animals necropsied	11				12				11				6			
No. of animals examined histologically	11				12				11				6			
Organ	Findings				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3			
ENDOCRINE SYSTEM																
adrenal gland	(11)				(12)				(11)				(6)			
infarct	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
vacuolic change	-	0	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
hyperplasia, cortex	-	5	0	0	-	3	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

-: Not applicable.

Table 8-3. Summary of histological findings (not copulation)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				8				40				200							
No. of animals not copulation	1				0				1				0							
No. of animals necropsied	1				0				1				0							
No. of animals examined histologically	1				0				1				0							
Organ	Findings				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3			
HEMATOPOIETIC SYSTEM																				
spleen	(1)				-				(1)				-							
deposit of pigment	-	1	0	0	-	-	-	-	-	0	1	0	-	-	-	-				
DIGESTIVE SYSTEM																				
liver	(1)				-				(1)				-							
infiltration/cellular	-	0	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-				
REPRODUCTIVE SYSTEM																				
testis	(1)				-				(1)				-							
atrophy	-	0	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-				
epididymis	(1)				-				(1)				-							
atrophy	-	0	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-				
prostate	(1)				-				(1)				-							
lymphocytic infiltration	-	1	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-				
ENDOCRINE SYSTEM																				
adrenal gland	(1)				-				(1)				-							
vacuolic change	-	1	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-				

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
 =: benign #: malignant
 Values are expressed number of animals with micro lesion.
 (): No. of animals examined microscopically at this site.

-: Not applicable.

Table 8-4. Summary of histological findings (not copulation)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0			8			40			200		
No. of animals not copulation	1			0			1			0		
No. of animals necropsied	1			0			1			0		
No. of animals examined histologically	1			0			1			0		
Organ _____ Findings _____	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
HEMATOPOIETIC SYSTEM												
spleen	(1)								(1)			
deposit of pigment	-	0	1	0	-	-	-	-	-	0	1	0
DIGESTIVE SYSTEM												
liver	(1)								(1)			
infiltration/cellular	-	0	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0
URINARY SYSTEM												
kidney	(1)								(1)			
basophilic change	-	0	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM												
uterus	(1)								(1)			
infiltration/cellular	-	0	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

-: Not applicable.

Table 8-5. Summary of histological findings (dead)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				8				40				200			
No. of animals dead	1				0				0				0			
No. of animals necropsied	1				0				0				0			
No. of animals examined histologically	1				0				0				0			
Organ Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
RESPIRATORY SYSTEM																
lung	(1)															
congestion	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
edema	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
 =: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.
 (): No. of animals examined microscopically at this site.

-: Not applicable.

Table 8-6. Summary of histological findings (all pups died)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0			8			40			200			
No. of animals all pups died	0			0			0			5			
No. of animals necropsied	0			0			0			5			
No. of animals examined histologically	0			0			0			5			
Organ	Findings			T 1 2 3			T 1 2 3			T 1 2 3			
HEMATOPOIETIC SYSTEM													
spleen										(5)			
deposit of pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	5	0
follicular atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
hematopoiesis, increased	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
thymus										(5)			
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0	0
RESPIRATORY SYSTEM													
lung										(5)			
accumulation of foamy cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
infiltration/cellular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM													
stomach										(5)			
ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
duodenum										(5)			
erosion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
large intestine										(5)			
ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
liver										(5)			
degeneration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
fatty change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
single cell necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
swelling of liver cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	0
URINARY SYSTEM													
kidney										(5)			
basophilic change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
hyaline droplet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0
mitosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0
protein cast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
tubular dilatation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
vacuolic change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0
fibrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

-: Not applicable.

Table 8-6. -continued Summary of histological findings (all pups died)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				8				40				200			
No. of animals all pups died	0				0				0				5			
No. of animals necropsied	0				0				0				5			
No. of animals examined histologically	0				0				0				5			
Organ	Findings				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3			
REPRODUCTIVE SYSTEM																
mammary gland	hyperplasia				-				-				(5) - 5 0 0			
ovary	cyst				-				-				(5) - 1 0 0			
uterus	retained placenta				-				-				(5) - 2 0 0			
ENDOCRINE SYSTEM																
pituitary gland	cyst				-				-				(5) - 1 0 0			
thyroid gland	ultimobranchial body				-				-				(5) - 1 0 0			
adrenal gland	infarct				-				-				(5) - 2 0 0			
	vacuolic change				-				-				- 2 0 0			

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

-: Not applicable.

Table 8-7. Summary of histological findings (dead)

Exp. No. 2282 (115-025)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0			8			40			200			
No. of animals dead	0			0			0			1			
No. of animals necropsied	0			0			0			1			
No. of animals examined histologically	0			0			0			1			
Organ	Findings			T 1 2 3			T 1 2 3			T 1 2 3			
HEMATOPOIETIC SYSTEM													
thymus										(1)			
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM													
stomach										(1)			
ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
liver										(1)			
single cell necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM													
mammary gland										(1)			
hyperplasia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

-: Not applicable.

Table 9

Copulation and fertility results in rats

Exp. No. 2282(115-025)

Dose level	0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	11	12	11	12
No. of pregnant females	11	12	11	12
Copulation index (%) a)	91.7	100	91.7	100
Fertility index (%) b)	100	100	100	100
Estrus cycle (days) (Mean±S.D.)	4.6±0.4	4.5±0.6	4.7±0.7	4.8±0.7

a) : (Number of animals with successful copulation / number of animals mated) x 100

b) : (Number of pregnant animals / number of animals with successful copulation) x 100

Dose level	0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
No. of dams observed	11	12	11	11
No. of dams delivered live pups	11	12	11	9
Duration of gestation (Mean±S.D.)	22.7±0.5	22.6±0.5	22.5±0.5	22.7±0.5
No. of total corpora lutea (Mean±S.D.)	203(18.5±2.7)	226(18.8±4.7)	219(19.9±2.7)	220(20.0±3.7)
No. of total implants (Mean±S.D.)	177(16.1±1.9)	191(15.9±2.1)	188(17.1±1.9)	179(16.3±2.7)
No. of total pups born (Mean±S.D.)	160(14.5±1.4)N	171(14.3±3.0)	167(15.2±2.9)	126(11.5±4.3)
No. of total live pups born (Mean±S.D.)	159(14.5±1.4)N	168(14.0±2.7)	167(15.2±2.9)	80(7.3±5.5) *
Male	72(6.5±2.7) f)	78(6.5±2.8) f)	77(7.0±2.8) f)	37(3.4±3.2) f)
Female	87(7.9±2.5) f)	90(7.5±2.6)	90(8.2±2.8) f)	43(3.9±3.5) * f)
Sex ratio (Mean±S.D.)	1.08±0.97	1.11±1.07	1.07±0.85	1.43±1.70 (9)
No. of total live pups on day 4 (Mean±S.D.)				
Male	63(5.7±2.6)	62(5.2±2.3)	65(5.9±2.1)	22(2.4±2.8) (9)
Female	79(7.2±3.1)	83(6.9±3.1)	77(7.0±3.2)	21(2.3±3.1) (9)
No. of total dead pups born (Mean±S.D.)	1(0.1±0.3)N	3(0.3±0.9)	0	46(4.2±5.3)
Gestation index (%) a)	100	100	100	81.8
Implantation index (%.Mean±S.D.) b)	88.2±11.8	86.7±12.0	87.4±15.1	83.4±16.8
Delivery index (%.Mean±S.D.) c)	90.9± 7.7N	89.6±14.6	88.5±12.1	69.9±22.2
Live birth index (%.Mean±S.D.) d)	99.4± 1.9N	98.7± 4.6	100 ± 0.0	65.5±42.5 *
Viability index on day 4 (%.Mean±S.D.) e)				
Male	89.3±19.2N	87.2±26.7	86.9±15.6	50.3±48.6 (9)
Female	89.9±22.2	87.7±28.6	84.4±23.9	42.2±43.6 * (9)

a) : (Number of females with live pups / number of pregnant females) x 100

b) : (Number of implants / number of corpora lutea) x 100

c) : (Number of pups born / number of implants) x 100

d) : (Number of live pups born / number of pups born) x 100

e) : (Number of live pups on day 4 after birth / number of live pups born) x 100

f) : Includes live pups died before observations

Values in parentheses are expressed number of litters observed

Significantly different from control group; *: P<0.05

N : Non parametric analysis

Table 11

External observations on live pups(F1) from rats

Exp. No. 2282(115-025)

Dose level	0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
No. of dams	11	12	11	9
No. of live pups examined	159	168	167	80
No. of live pups with external anomalies (% Mean±S.D.)	0	2 (1.0±3.6)	0	1 (1.0±2.7) (7)
Type and incidence of external anomalies (%) a)				
Trauma	0	1 (0.6)	0	0
Hypodermic hemorrhage	0	1 (0.6)	0	1 (1.3)

a) : (Number of live pups with external anomalies / number of live pups) x 100
 Values in parentheses are expressed number of dams examined

Table 12

Body weight change of pups(F1) from rats

Exp. No. 2282(115-025)

Unit : g

Dose level		0 mg/kg	8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg
No. of litters		11	12	11	7
Male					
Days after birth	0	6.6 ± 0.6	6.4 ± 0.6	6.4 ± 0.7	6.2 ± 1.1
	4	9.4 ± 1.5	8.8 ± 1.9	8.8 ± 2.2	8.0 ± 2.5 (5)
Female					
Days after birth	0	6.2 ± 0.6	6.2 ± 0.6	5.9 ± 0.7	5.8 ± 1.1
	4	9.0 ± 1.5	9.0 ± 1.3 (11)	8.5 ± 2.0	8.0 ± 1.9 (5)

Values are expressed as Mean±S.D.

Values in parentheses are expressed number of litters measured

Table 13-1 Summary of gross findings of pups(F1) from rats(sacrificed)

Exp. No. 2282(115-025)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	8	40	200	
No. of pups necropsied	63	62	65	21	
Organ_____ Findings_____					
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
thymus	thymic remnant in the neck	0	2	0	0
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	white patch/zone	0	0	1	0
URINARY SYSTEM					
kidney	dilated pelvis	0	1	0	0

Table 13-2 Summary of gross findings of pups(F1) from rats(sacrificed)

Exp. No. 2282(115-025)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	8	40	200
No. of pups necropsied	79	83	77	21
Organ----- Findings-----				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
thymus				
thymic remnant in the neck	1	2	0	0
URINARY SYSTEM				
kidney				
dilated pelvis	1	0	0	0