

フマル酸ジエチルのラットにおける反復投与  
毒性・生殖発生毒性併合試験報告書

株式会社化合物安全性研究所

# 目 次

	頁
表題・試験番号	
要 約 .....	3
緒 言 .....	4
材料及び方法 .....	4
成 績 .....	14
考 察 .....	20
Figures and tables .....	別添

表 題 フマル酸ジエチルのラットにおける反復投与毒性・生殖発生毒性  
併合試験

試験番号 SR-9233

## 要 約

フマル酸ジエチル (CAS No.623916) の 11、30及び 100mg/kg/day を雄ラットの交配前及び交配期間を含む46日間、雌ラットの交配前、交配及び妊娠期間、哺育3日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖及び次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験し、以下の知見が得られた。

### 1. 雌雄動物の反復投与毒性

- (1)前胃において、粘膜層の肥厚が 11mg/kg以上の群の雌雄で、過角化が 11mg/kg以上の群の雄及び 30mg/kg以上の群の雌で認められ、用量依存的に出現例数は増え、所見の程度も重くなる傾向がみられた。また、粘膜下織における水腫、潰瘍及び限局性の粘膜固有層における水腫が 30mg/kg群の雄あるいは雌に、粘膜層表層における水胞形成が 30mg/kg以上の群の雄に認められた。
- (2)腎臓及び肝臓において、重量あるいは体重重量比の増加が 100mg/kg 群の雌雄で認められた。
- (3)胸腺において、萎縮が 30及び 100mg/kg群の雌で認められた。
- (4)その他に、一般状態観察、体重推移、摂餌量、尿検査、血液学的検査及び血液化学的検査では、フマル酸ジエチル投与による影響は認められなかった。
- (5)以上より、11mg/kg群の雌雄でも前胃にフマル酸ジエチルの刺激による変化が認められたことから、本スクリーニング試験におけるフマル酸ジエチル反復投与による無影響量 (NOEL) は雌雄ともに投与可能な最小量である 11mg/kg/day未満であることが示唆された。

### 2. 雌雄動物の生殖毒性及び次世代の発生毒性

- (1)生殖能検査、生殖器の重量及び病理組織学的検査、分娩及び母性行動観察、新生児の生存性、一般状態観察、体重推移及び剖検では、フマル酸ジエチル投与による影響は認められなかった。
- (2)以上より、フマル酸ジエチルの生殖発生に対する影響は認められないことから、本スクリーニング試験におけるフマル酸ジエチルの雌雄動物の生殖及び次世代の発生に対する無影響量は 100mg/kg/day であることが示唆された。

## 要 言

フマル酸ジエチル (CAS No. 623918) を雄ラットの交配 14日前より 48日間、雌ラットの交配前14日間、交配及び妊娠期間、哺育 3日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖及び次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験したので、その成績を報告する。

なお、本試験は「OECD優良試験所指針C (81) 30最終別添 2」に従い、試験方法は OECDテストガイドライン及び OECD提案ガイドライン (Combined Repeat Dose and Reproduction/Developmental Toxicity Screening test) に準拠した。

## 材料及び方法

### 1. 被験物質

被験物質は、より提供されたフマル酸ジエチル (CAS No.623918、以下、DEF と略す。Lot番号： ) である。被験物質は、特有の刺激的な臭いのする無色透明の液体 (比重 1.053) であり、室温、遮光下で保存した (製品分析試験成績表：平成 3年 8月 3日付)。なお、被験物質は原液をそのまま使用した。

### 2. 試験動物

生後 8週齢の Crj: CD (SD) 系 SPFラット (雄: 55匹、体重範囲 263~291g、雌: 55匹、体重範囲 189~197g) を 1992年 10月 7日に日本チャールス・リバー株式会社より受け入れ、18日間の馴化飼育を行った。馴化期間中、一般状態観察を 1日 1回、体重測定を期間中 3回実施し、順調な発育を示した動物を試験に用いた。なお、雌については、期間中、性周期検査を行い、性周期に異常の認められない動物を用いた。

### 3. 飼育環境条件

動物の飼育は、温度  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 10\%$ 、換気回数 10~15回/時間、照明時間 12時間 (午前 8時から午後 8時まで点灯) に設定されたバリアシステムの飼育室 (135号室) において、ブラケット式金属製金網床ケージ (250W×380D×180H, mm) を用いて行った。ただし、妊娠 17日より金属網床のかわりに実験動物用床敷 (ホワイトプレート、日本チャールス・リバー株式会社) を敷いたステンレス製受皿を使用した。ケージ当た

りの収容匹数は、群分け前は4匹以内、群分け後は1匹、交配中は雌雄各1匹、妊娠期間中は1母動物、哺育期間中は1腹とした。ケージの交換は2週に1回の頻度で行った。

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

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

飼料の分析及び検査は財団法人日本食品分析センターで実施(分析試験成績書: 第45091070-001、45100253-001及び45110169-001号)し、各混入物質について当社SOPの許容範囲内であることを確認した。飲料水の水質検査は株式会社福田水文センターで実施(水質検査結果書: 第04512、04517及び05502号)し、当社SOPの水質基準の範囲内であることを確認した。

#### 4. 試験群の設定、群分け及び個体識別

試験群は、本試験の用量設定試験(別添、14日間反復投与試験)の結果を参考に設定した。すなわち、最高用量である1000mg/kg群で死亡例あるいは衰弱屠殺例が雌雄全例に、100及び300mg/kg群ではDEFの刺激による変化である前胃粘膜上皮の肥厚及び過角化が雌雄全例に、腎臓の重量あるいは体重重量比の増加が雌雄に認められた。これらのことから、本試験の高用量は投与期間の延長を考慮して前胃に影響が現れた100mg/kg/day、低用量は投与可能な最小量である11mg/kg/day、中間用量はそれらの等比中項である30mg/kg/day(公比約3)とし、さらに日本薬局方精製水を投与する対照を設け、計4群とした(Table1)。

動物数は1群あたり雌雄各12匹とした。群分けは、馴化期間の最終日(投与開始前日)に各群の体重が均一になるように体重別層化無作為抽出法により行った。

動物の識別は、受入時に油性フェルトペンを用いて尾部にケージ内個体識別を、群分け時に入墨により群識別を右耳に、群内個体識別を左耳に行った。ケージには性別毎に色分けしたカードに試験番号、試験群、グループ番号及び動物番号を明記して標示した。なお、新生児については、油性フェルトペンを用いて背部に雄は青色、雌は紫色で動物番号を記し、ケージ内個体識別を行った。

## 5. 投与経路及び投与方法

投与経路は、被験物質が人体に経口的に暴露される可能性があることから、経口投与とした。投与は胃ゾンデを用いて強制的に胃内に行った。投与容量は、被験物質が原液として規定の用量となるように体重1kg当たり0.010、0.028及び0.095mlとして投与日に最も近い日に測定した体重に基づいて算出した。なお、対照物質の投与量は体重1kg当たり0.095mlとし、体重測定当日の投与容量はその日の体重に基づいて算出した。

投与期間は、雄については交配前14日間及び交配期間を含む46日間、雌については交配前14日間及び交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間及び哺育3日までの期間とした。投与時刻は、午前10時から午後1時の間とした。

投与は10週齢から開始し、投与開始時の平均体重（体重範囲）は雄で413.1g（388～447g）、雌で239.5g（220～261g）であった。

## 6. 観察、測定及び検査項目

### 1) 雄動物について

#### (1) 一般状態観察

全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で、視診及び触診により行動、外観などを観察した。また、発現した症状についてはその種類及び持続時間を記録した。

#### (2) 体重測定

全例について、投与1日（投与前）、投与2、5、7、10及び14日、その後は7日毎に（投与終了日を含む）、さらに剖検日に電子天秤（ザルトリウス 1401 BMP7-2 及び 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。また、体重増加量 [投与46日体重 - 投与1日体重] 及び体重増加率 [ (体重増加量 / 投与1日体重) × 100 ] を算出した。

#### (3) 摂餌量測定

全例について、投与1日（投与前）、投与2、5、7、10及び14日、その後は交配期間を除き体重測定日と同じ日（投与終了日を含む）に電子天秤（ザルトリウス1401 BMP7-2 及び 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。適当量をケージ毎にセットし、翌日に残量を測定し、1匹当たりの1日分の摂餌量を算出した。

#### (4)尿検査

投与期間の最終週（投与43～44日）に各群5例についてラット用代謝ケージ（KN-646 B-1型、夏目製作所）に収容して非絶食下で採尿を行った。約3時間の蓄尿の一部を用いて①～⑧の項目を検査し、21時間蓄尿を用いて、⑨～⑬の項目の検査を行った。

①pH	試験紙法（マルティステイックス：マイルス・三共）
②蛋白（Pro）	試験紙法（マルティステイックス：マイルス・三共）
③糖（Glu）	試験紙法（マルティステイックス：マイルス・三共）
④ケトン体（Ket）	試験紙法（マルティステイックス：マイルス・三共）
⑤ウロビリノーゲン（Uro）	試験紙法（マルティステイックス：マイルス・三共）
⑥ビリルビン（Bil）	試験紙法（マルティステイックス：マイルス・三共）
⑦潜血反応（Occult blood）	試験紙法（マルティステイックス：マイルス・三共）
⑧沈渣（Sediment）	ステルンハイマー変法染色標本鏡検
⑨比重（Grav）	屈折計法（アタゴ製ニリコン）
⑩尿量（U-Vol）	メスシリンダーによる容量測定
⑪ナトリウム（U-Na）	炎光法（コーニング 480型炎光光度計）
⑫カリウム（U-K）	炎光法（コーニング 480型炎光光度計）
⑬クロール（U-Cl）	電量滴定法（平沼 CL-6M型クロライドカウンター）
⑭採尿中の飲水量	重量測定

#### (5)血液学的検査

投与46日の翌日に全例について、約16時間絶食した後、エーテル麻酔下で大腿静脈より採血し、EDTA・2Kで処理した血液を用いて、①～⑨、⑬の項目について検査を行った。さらに、⑩の項目は無処理血液を用いて、⑪、⑫の項目については腹部大動脈より採血し、クエン酸ナトリウムで処理した後、3000 rpmで10分間遠心分離して得られた血漿を用いて検査を行った。

①赤血球数（RBC）	電気抵抗法（コールター原理） （コールターカウンター T660型）
②ヘマトクリット値（Ht）	RBC, MCV値より算出 （コールターカウンター T660型）

③血色素量 (Hb)	シアンメトヘモグロビン法 (国際法) (コールターカウンター T660型)
④平均赤血球容積 (MCV)	電気抵抗法 (コールター原理) (コールターカウンター T660型)
⑤平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)	RBC, Hb値より算出 (コールターカウンター T660型)
⑥平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)	Ht, Hb値より算出 (コールターカウンター T660型)
⑦網赤血球率 (Ret)	Brecher法
⑧血小板数 (Plat)	電気抵抗法 (コールター原理) (コールターカウンター T660型)
⑨白血球数 (WBC)	電気抵抗法 (コールター原理) (コールターカウンター T660型)
⑩凝固時間 (CT)	流体粘度変化による空気圧測定法 (グライナー社製マイクロコアグロメーター)
⑪プロトロンビン時間 (PT)	トロンボプラスチン法 (AMELUNG KC-10A バクスターKK)
⑫活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	エラジン酸法 (AMELUNG KC-10A バクスターKK)
⑬白血球型別百分率 (Hemogram of WBC)	メイ・ギムザ染色標本鏡検

#### (6)血液化学的検査

投与46日の翌日に全例について、血液学的検査のための採血後、腹部大動脈より採血し 3000rpm で 10分間の遠心分離して、得られた血清を用いて次の検査を行った。

①GOT	IFCC法 (日立 7150形自動分析装置)
②GPT	IFCC法 (日立 7150形自動分析装置)
③ $\gamma$ -GTP	包接L- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (日立7150形自動分析装置)
④アルカリフォスファターゼ (ALP)	ベッセイ・ローリー法 (日立7150形自動分析装置)

⑤ コリンエステラーゼ (ch-E)	ヨウ化ブチリルチオコリン基質法 (日立7150形自動分析装置)
⑥ 血糖 (Glu)	ヘキソキナーゼ法 (日立 7150形自動分析装置)
⑦ 総コレステロール (T-Cho)	酵素法 (日立 7150形自動分析装置)
⑧ トリグリセリド (TG)	遊離グリセロール消去法 (日立 7150形自動分析装置)
⑨ リン脂質 (PL)	酵素法 (日立7150形自動分析装置)
⑩ 総ビリルビン (T-Bil)	アゾビリルビン法 (日立7150形自動分析装置)
⑪ 尿素窒素 (BUN)	ウレアーゼ・インドフェノール法 (日立 7150形自動分析装置)
⑫ クレアチニン (Crea)	ヤッフエ法 (日立 7150形自動分析装置)
⑬ ナトリウム (Na)	炎光法 (コーニング 480型炎光光度計)
⑭ カリウム (K)	炎光法 (コーニング 480型炎光光度計)
⑮ クロール (Cl)	電量滴定法 (平沼 CL-6M型クロライドカウンター)
⑯ カルシウム (Ca)	OCPC法 (日立 7150形自動分析装置)
⑰ 無機リン (P)	フィスケ・サバロー法 (日立 7150形自動分析装置)
⑱ 総蛋白 (TP)	ビウレット法 (日立 7150形自動分析装置)
⑲ アルブミン (Alb)	BCG法 (日立 7150形自動分析装置)
⑳ A/G比 (A/G)	TP, Alb値より算出する。
㉑ 蛋白分画	セルロースアセテート膜電気泳動法

(7) 剖検及び器官重量測定

投与46日の翌日に全例について、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後放血致死させ、全身の器官及び組織を肉眼的に観察した。摘出器官のうち、肝臓、腎臓(左右)、胸腺、副腎(左右)、精巣及び精巣上体(左右)の重量を電子天秤(ER-180A、エー・アンド・ディ株式会社)を用いて測定した。また、器官体重重量比〔(器官重量/動物体重)×100〕を算出した。

### (3) 病理組織学的検査

全例について、剖検時に肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳（大脳・小脳）、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、脾臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、眼球、ハーダー腺、胸骨及び大腿骨（骨髓を含む）、脊髄（頸部）、骨格筋（外側広筋）、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精巣、精巣上体、精嚢（凝固腺を含む）、前立腺及び異常所見部位を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。なお、眼球及びハーダー腺はデビッドソン液で、精巣及び精巣上体はブアン液で固定・保存した。摘出器官のうち、全例の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、下垂体、胸腺、副腎、甲状腺、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣、精巣上体、前立腺及び異常所見部位について、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色及び特殊染色（アルシアンブルー染色）標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

### 2) 嚙動物について

#### (1) 一般状態観察

全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で、視診及び触診により行動、外観などを観察した。また、発現した症状についてはその種類及び持続時間を記録した。

#### (2) 体重測定

全例について、投与1日（投与前）、投与2、5、7、10及び14日、妊娠0、1、3、5、7、10、14、17及び20日、哺育0、1及び4日に、電子天秤（ザルトリウス1401 BMP7-2 及び 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。また、体重増加量〔（投与14日体重－投与1日体重）、（妊娠20日体重－妊娠0日体重）及び（哺育4日体重－哺育0日体重）〕、及びそれぞれの体重増加量に対応した体重増加率〔（体重増加量／投与1日体重）× 100、（体重増加量／妊娠0日体重）× 100 及び（体重増加量／哺育0日体重）× 100〕を算出した。

#### (3) 摂餌量測定

全例について、投与1日（投与前）、投与2、5、7、10及び14日、妊娠1、3、5、7、10、14、17及び20日、哺育1及び4日に、電子天秤（ザルトリウス1401 BMP7-2及び 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。適当量をケージ毎にセットし、翌日に残量を測定し、1匹当たりの1日分の摂餌量を算出した。

#### (4) 剖検及び器官重量測定

交尾成立例は哺育4日に、交尾不成立例は交配期間終了の翌日に、妊娠25日まで分娩の認められない例は妊娠26日にエーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、子宮の着床痕及び卵巣の妊娠黄体を計数した。摘出器官のうち、肝臓、腎臓（左右）、胸腺、副腎（左右）及び卵巣（左右）の重量を電子天秤（ER-180A、エー・アンド・ディ株式会社）を用いて測定した。また、器官体重量比〔（器官重量／動物体重）× 100〕を算出した。

#### (5) 病理組織学的検査

全例について、剖検時に肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳（大脳・小脳）、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、膵臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、眼球、ハーダー腺、胸骨及び大腿骨（骨髄を含む）、脊髄（頸部）、骨格筋（外側広筋）、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃（前胃、腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、卵巣、子宮、膈及び異常所見部位を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。なお、眼球及びハーダー腺はデビッドソン液で固定・保存した。摘出器官のうち、全例の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、下垂体、胸腺、副腎、甲状腺、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、卵巣及び異常所見部位について、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは特殊染色（PAS、 $\alpha$ -アミラーゼ及びoil red O染色）標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

### 3) 雌雄動物の生殖及び次世代の発生について

#### (1) 性周期検査

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

#### (2) 生殖能検査

投与14日の雌雄について、同試験群内で夕方より1対1で最長14日間同居させた。交尾の成立は雌の膈垢中に精子が確認された場合とし、妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とした。また、交尾率〔（交尾成立ラット数／同居ラット数）× 100〕及び受胎率〔（受胎ラット数／交尾成立ラット数）× 100〕を算出した。

### (3) 分娩及び母性行動観察

交尾した雌全例について、分娩状態、母性行動、総出産児数、生存児数及び死亡児数、出産児の性別及び外表を観察した。また、着床率  $[(\text{着床痕数}/\text{妊娠黄体数}) \times 100]$ 、出産率  $[(\text{生児を出産した雌ラット数}/\text{妊娠雌ラット数}) \times 100]$ 、分娩率  $[(\text{総出産児数}/\text{着床痕数}) \times 100]$ 、出生率  $[(\text{出産確認時生存児数}/\text{総出産児数}) \times 100]$ 、哺育4日時哺育率  $[(\text{正常に哺育した雌ラット数}/\text{正常に分娩した雌ラット数}) \times 100]$ 、性比  $[\text{雌生児数}/\text{雄生児数}]$  及び妊娠期間  $[\text{分娩終了日}(\text{分娩終了を確認した日})\text{までの妊娠日数}]$  を算出した。

### (4) 新生児の一般状態観察及び生存性

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

### (5) 新生児の体重測定

全例について、哺育0、1及び4日に電子天秤(ザルトリウス 1401 BMP7-2、カールツァイス株式会社)を用いて測定した。なお、体重値は雌雄別に1腹を単位とした平均値で示した。また、体重増加量  $[\text{哺育4日体重} - \text{哺育0日体重}]$  及び体重増加率  $[(\text{体重増加量}/\text{哺育0日}) \times 100]$  を算出した。

### (6) 新生児の剖検

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

## 7. 統計処理

体重、体重増加量及び体重増加率、摂餌量、器官重量、器官体重重量比、妊娠黄体数、着床痕数及び着床率、総出産児数、出産確認時生存児数、分娩率、出生率、性比、出産確認時死亡児数、妊娠期間、哺育4日生存児数及び新生児生存率については、Bartlettの検定法によって分散を検定した。その結果、等分散 ( $p > 0.05$ ) を示した項

目については一元配置分散分析法によって解析し、有意な場合 ( $p < 0.10$ )、Dunnnettの検定法 (各試料の大きさが違う場合は有効反復数を用いた) により対照群と DEF 投与群との比較を行った。一方、不等分散 ( $p < 0.05$ ) を示した項目については Kruskal-Wallis 法により解析し、有意な場合 ( $p < 0.10$ )、Mann-Whitney の U-検定法により対照群と DEF 投与群との比較を行った。なお、分娩及び母性行動観察結果、新生児の生存性及び体重については、1 腹を単位として検定を行った。

交尾率、受胎率、出産率及び哺育率については多試料  $\chi^2$ -検定を行い、その結果、有意な場合は 2 試料  $\chi^2$ -検定を行った。ただし、2 試料  $\chi^2$ -検定あるいは多試料  $\chi^2$ -検定に不適合の場合は Fisher の正確確率検定法により行った。

なお、対照群との検定については、危険率 5% 以下を統計学的に有意とした。

## 成 績

### 1. 雄動物の反復投与毒性

#### (1) 一般状態観察

- 一般状態観察の成績を Table 2、INDIVIDUAL DATA 1-1~1-4 に示した。  
投与期間を通して異常は認められなかった。

#### (2) 体重推移

- 体重推移を Figure 1、Table 3、INDIVIDUAL DATA 2-1~2-4 に示した。  
投与期間を通して対照群と比較して有意な差は認められなかった。

#### (3) 摂餌量

- 摂餌量の変化を Figure 2、Table 4、INDIVIDUAL DATA 3-1~3-4 に示した。  
対照群と比較して有意な差は認められなかった。

#### (4) 尿検査

- 尿検査の成績を Table 5、INDIVIDUAL DATA 4-1~4-8 に示した。  
対照群と比較して 30mg/kg 群で尿量の減少が認められたが、用量依存性の欠いた変動であった。

#### (5) 血液学的検査

- 血液学的検査の成績を Table 6、INDIVIDUAL DATA 5-1~5-8 に示した。  
対照群と比較して 30mg/kg 群で赤血球数の減少、平均赤血球容積及び平均赤血球ヘモグロビン量の増加が、100mg/kg 群で平均赤血球ヘモグロビン濃度の増加が認められたが、用量依存性の欠いた変動あるいは背景データの範囲内の変動 (Appendix 1) であった。

#### (6) 血液化学的検査

- 血液化学的検査の成績を Table 7、INDIVIDUAL DATA 6-1~6-8 に示した。  
対照群と比較して 30mg/kg 群でコリンエステラーゼの増加が認められたが、用量依存性を欠いた変動であった。

## (7) 器官重量

器官重量及び器官体重重量比の成績を Table 8、INDIVIDUAL DATA 7-1~7-8 に示した。

対照群と比較して 100mg/kg 群で肝臓の体重重量比、腎臓（左右）の重量及び体重重量比の増加が認められた。その他に 11mg/kg群で腎臓（左）の体重重量比の増加、30mg/kg 群で精巣上体（左）の重量及び体重重量比の増加が認められたが、片側性あるいは用量依存性を欠く変動であった。

## (8) 剖検

剖検の成績を Table 9、INDIVIDUAL DATA 8-1~8-4、Photo. M-1に示した。

前胃において、粘膜の肥厚が 30mg/kg群の 3 例及び 100mg/kg群の全例（12例）に認められた。このうち、30mg/kg群の 1 例で粘膜下水腫が、30mg/kg群の他の 1 例及び 100mg/kg群の 2 例で粘膜の一部暗赤色化が認められた。

その他に腺胃の粘膜下に白色腫瘤が対照群の 1 例に、精巣上体（右）の一部黄白色化が 100mg/kg群の 1 例に認められた。

## (9) 病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 10、INDIVIDUAL DATA 9-1~9-4、Photo.H-1~H-3 に示した。

前胃において、粘膜層の肥厚及び過角化が 11mg/kg以上の群で認められ、用量依存的に出現例数は増え、所見の程度も重くなる傾向がみられた [粘膜層の肥厚；11mg/kg群：7 例（軽度）、30mg/kg群：11例（軽度）、100mg/kg群：4 例（軽度）、7 例（中等度）及び 1 例（重度）／過角化；11mg/kg群：2 例（軽度）、30mg/kg群：10 例（軽度）、100mg/kg群：4 例（軽度）及び 8 例（中等度）]。このうち、30mg/kg群の 1 例で粘膜下織における水腫が、30mg/kg群の他の 1 例及び 100mg/kg群の 2 例で粘膜層表層における水胞形成が伴って認められた。

不妊例ではその原因を示唆する所見は認められなかった。

その他に肝臓に限局性の胆管増生、腎臓に尿細管上皮の硝子滴及び好酸体の沈着、尿細管上皮の再生、線維化、心臓に組織球細胞を主とする限局性の細胞浸潤、肺に限局性のうっ血、血管壁における石灰沈着、下垂体に線毛上皮嚢胞、精巣に精細管の萎縮、前立腺にリンパ球を主とする間質における細胞浸潤が用量依存性なく散発的に認められた。なお、腺胃粘膜下に白色腫瘤のみられた対照群の 1 例に扁平上皮嚢胞が、

精巢上体（右）に黄白色化のみられた 100mg/kg 群の 1 例に精子肉芽腫が認められた。

## 2. 雌動物の反復投与毒性

### (1) 一般状態観察

一般状態観察の成績を Table 11、INDIVIDUAL DATA 10-1~12-4に示した。

妊娠前投与期間中では、異常は認められなかった。

妊娠期間中では、30mg/kg群の 1 例で妊娠 19日に膈からの出血及び手足及び耳介の蒼白、妊娠19及び20日に眼球の褪色が認められた。

哺育期間中では、異常は認められなかった。

### (2) 体重推移

体重推移を Figure 3~5、Table 12~14、INDIVIDUAL DATA 13-1~15-4に示した。

妊娠前投与期間、妊娠期間及び哺育期間では、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

### (3) 摂餌量

摂餌量の変化を Figure 6~8、Table 15~17、INDIVIDUAL DATA 16-1~18-4に示した。

妊娠前投与期間では、100mg/kg群で摂餌量の減少が投与5日に一過性に認められたが、投与期間を通してはこのような傾向は認められなかった。

妊娠期間及び哺育期間では、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

### (4) 器官重量

器官重量及び器官体重重量比の成績を Table 18、INDIVIDUAL DATA 19-1~19-4に示した。

対照群と比較して 100mg/kg 群で肝臓及び腎臓（左右）の体重重量比の増加が認められた。

### (5) 剖検

剖検の成績を Table 19、INDIVIDUAL DATA 20-1~20-4、Photo. M-2 に示した。

前胃において、粘膜の肥厚が 30mg/kg群の 3 例及び 100mg/kg 群の全例（12例）に認められた。

その他に卵管（右）の内腔拡張及び子宮（右側）の低形成が 30mg/kg群の 1 例に認められた。また、分娩遅延がみられ妊娠 26日に屠殺した 2 例のうち、30mg/kg 群の 1 例では子宮内（右側）に死亡胎児が認められた。100mg/kg群の 1 例では膈の隔壁形成

がみられ、腔内には死亡胎児が認められた。

#### (6) 病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 20、INDIVIDUAL DATA 21-1~21-4、Photo. H-4 に示した。

前胃において、粘膜層の肥厚が 11mg/kg 以上の群で、過角化が 30mg/kg 以上の群で認められ、用量依存的に出現例数は増え、所見の程度も重くなる傾向がみられた [粘膜層の肥厚；11mg/kg 群：2 例（軽度）、30mg/kg 群：7 例（軽度）及び 1 例（中等度）、100mg/kg 群：9 例（軽度）及び 3 例（中等度）／過角化；30mg/kg 群：4 例（軽度）及び 1 例（中等度）、100mg/kg 群：9 例（軽度）及び 2 例（中等度）]。このうち、30mg/kg 群の 1 例で潰瘍が、30mg/kg 群の他の 1 例で限局性の粘膜固有層における水腫が伴って認められた。

胸腺において、萎縮が 30mg/kg 群の 1 例（中等度）及び 100mg/kg 群の 4 例（軽度）に認められた。

不妊例ではその原因を示唆する所見は認められなかった。

その他に腎臓（左）に遠位を主とする限局性の尿細管上皮の萎縮及び尿細管の拡張、腎盂粘膜における石灰沈着、肺に血管壁における石灰沈着、下垂体にラトケ嚢内均質血漿様物質貯留、卵巢（右）に黄体嚢胞が用量依存性なく散発的に認められた。なお、剖検時異常部位に対応して、卵管（右）の拡張及び子宮（右側）の低形成が 30mg/kg 群の 1 例に、卵巢（右）の卵胞嚢胞及び腔の隔壁形成が 100mg/kg 群の 1 例に認められた。

### 3. 雌雄動物の生殖毒性及び次世代の発生毒性

#### (1) 生殖能検査

生殖能検査の成績を Table 21、INDIVIDUAL DATA 22-1-1~22-4-2 に示した。

投与前期間と投与期間の性周期に DEF 投与との関連を示唆する変化は認められなかった。

対照群と比較して交尾までの日数及び受胎率に有意な差は認められず、交尾率はいずれの群も 100% であった。なお、不妊は対照群で 1 組、11mg/kg 群で 2 組、30 及び 100mg/kg 群で各 1 組に認められた。

## (2) 分娩及び母性行動観察

分娩及び母性行動観察の成績を Table 22、INDIVIDUAL DATA 23-1~23-4に示した。

対照群と比較して、妊娠黄体数、着床痕数、着床率、総出産児数、分娩率、出産確認時生存児数、出生率、性比、出産確認時死亡児数、妊娠期間、出産率及び哺育率に有意な差は認められなかった。

分娩異常として、妊娠 26日までに分娩が認められず、妊娠 26日に屠殺した例（分娩遅延例）が 30及び 100mg/kg群で各 1例に認められた。30mg/kg群の 1例では、子宮内に死亡胎児が 1例認められ、妊娠黄体及び着床痕が各 1箇認められた。なお、本例は妊娠期間の末期に腔からの出血、手足・耳介の蒼白及び眼球の褪色が認められた例であった。100mg/kg群の 1例では、腔内に死亡胎児が 1例認められ、妊娠黄体が 2箇、着床痕が 1箇認められた。なお、本例は腔の隔壁形成が認められた例であった。哺育異常はいずれの群においても認められなかった。

## (3) 新生児の生存性

新生児の生存性の成績を Table 23、INDIVIDUAL DATA 24-1~24-4に示した。

対照群と比較して新生児生存率に有意な差は認められなかった。なお、対照群と比較して 100mg/kg 群で哺育4日の雄新生児数の増加が認められたが、新生児総数では有意な差は認められなかった。

## (4) 新生児の一般状態観察

新生児の一般状態観察の成績を Table 24、INDIVIDUAL DATA 25-1~25-4 に示した。

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

対照群では、哺育2及び4日の死亡が雄 64例雌 83例中、雄4例雌1例に、背部及び後腹部の乳白色化が雄1例に、左胸部の外傷が雌1例に認められた。30mg/kg 群では、哺育0（分娩後）及び1日死亡が雄 57例雌 69例中、雄3例雌1例に認められた。100mg/kg群では、哺育1及び2日死亡が雄 71例雌 60例中、雄2例雌1例に、頭部及び頬部の外傷、左頬部の暗赤色化が雄1例に認められた。

## (5) 新生児の体重推移

新生児の体重推移を Figure 9、Table 25、INDIVIDUAL DATA 26-1~26-4に示した。

対照群と比較して有意な差は認められなかった。

#### (6) 新生児の剖検

新生児の剖検の成績を Table 26、INDIVIDUAL DATA 27-1-1～27-4-2に示した。

雌雄ともに DEF投与との関連を示唆する所見は認められなかった。なお、認められた所見は次の通りであった。

死亡例のうち、対照群の雌1例で心臓に血餅の付着、肺の左葉の暗赤色化、胸部及び背部の外傷、左側胸部の外傷部位から胸腔に穿孔が、100mg/kg群の雄1例で小脳の一部暗赤色化が認められた。

哺育4日に屠殺した例のうち、対照群の雌1例で左胸部に外傷（一般状態観察時所見部位）が認められた。

## 考 察

DEF の 11、30及び 100mg/kg/dayを雄ラットの交配前及び交配期間を含む46日間、雌ラットの交配前、交配及び妊娠期間、哺育3日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖及び次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験を実施した。

前胃において、粘膜刺激性（1992年8月3日付書類）を有する DEFの直接的な刺激によると考えられる所見が認められた。すなわち、粘膜層の肥厚が 11mg/kg以上の群の雌雄で、過角化が 11mg/kg以上の群の雄及び 30mg/kg以上の群の雌で認められ、用量依存的に出現例数は増え、所見の程度も重くなる傾向がみられた。また、粘膜下織における水腫、潰瘍及び限局性の粘膜固有層における水腫が 30mg/kg群の雄あるいは雌に、粘膜層表層における水胞形成が 30mg/kg以上の群の雄に認められた。

腎臓及び肝臓において、重量あるいは体重重量比の増加が 100mg/kg群の雌雄で認められた。しかしながら、いずれの器官についても、形態的に異常は認められず、尿及び血液検査においても関連する変化は認められなかった。なお、腎臓では他に尿細管上皮の再生及び線維化、遠位を主とする尿細管上皮の萎縮及び尿細管の拡張が DEF投与群の少数例に認められた。しかし、これらの所見は極く軽度あるいは限局性で通常認められる程度のもの（Appendix 2-1,2-2）であることから、DEF投与との関連性はないと判断された。

胸腺において、萎縮が 30及び100mg/kg群の雌で認められたが、その原因は不明であった。

その他に一般状態観察、体重推移、摂餌量、尿検査、血液学的検査及び血液化学的検査では DEF投与による影響は認められなかった。

以上より、11mg/kg群の雌雄でも前胃に DEFの刺激による変化が認められたことから、本スクリーニング試験における DEF反復投与による無影響量（NOEL）は雌雄ともに投与可能な最小量である 11mg/kg/day未満であることが示唆された。

生殖能検査では、雌の性周期、雌雄の交尾及び受胎に対して DEF投与による影響は認められなかった。また、生殖器（精巢、精巢上体及び卵巣）の重量や病理組織学的検査においても DEF投与による影響は認められなかった。なお、不妊例の生殖器にその原因を示唆する病理組織学的所見は認められなかった。

分娩異常として、分娩遅延例（妊娠 26日までに分娩が認められなかった例）が 30及び 100mg/kg群で各 1例に認められた。30mg/kg群の分娩遅延例の剖検では子宮内に死亡胎児

が1例認められた。本例は、他に妊娠期間の末期に膣からの出血や手足・耳介の蒼白及び眼球の褪色が認められ、子宮内における胎児死亡との関連が示唆された。100mg/kg群の分娩遅延例では膣内に死亡胎児が1例認められた。また、本例には膣の隔壁形成もみられ、先天的な要因による産道障害で膣内に胎児が停留したものと考えられた。これらの分娩遅延例はいずれも妊娠黄体及び着床痕が1あるいは2箇所と少数であり、同様な例は背景データ (Appendix 3) でも認められることから、DEF 投与との関連性はないものと考えられた。これらのことと、上記の分娩遅延例以外の妊娠例には何ら異常は認められなかったことから、妊娠、分娩及び母性行動に関して、DEF 投与による影響はないものと考えられた。

新生児の観察では、生存性、一般状態観察、体重推移及び剖検において DEF 投与による影響は認められなかった。

以上より、DEF の生殖・発生に対する影響は認められないことから、本スクリーニング試験における DEF の雌雄動物の生殖・発生に対する無影響量は 100mg/kg/day であることが示唆された。

## Figures

- Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Figure 9. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study of DEF in rats

## Tables

- Table 1. Experimental design for the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study of DEF in rats
- Table 2. General appearance of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 5. Urinary findings of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 6. Hematological findings of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 7. Biochemical findings of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 8. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 9. Gross findings of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

- Table 10. Histopathological findings of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 11. General appearance of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 12. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 13. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 14. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 15. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 16. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 17. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 18. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 19. Gross findings of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 20. Histopathological findings of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 21. Influence of DEF on reproductive ability of rats in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study
- Table 22. Influence of DEF on delivery and maternal behavior in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study in rats
- Table 23. Influence of DEF on viability of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study in rats
- Table 24. General appearance of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study of DEF in rats
- Table 25. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study of DEF in rats
- Table 26. Gross findings of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study of DEF in rats

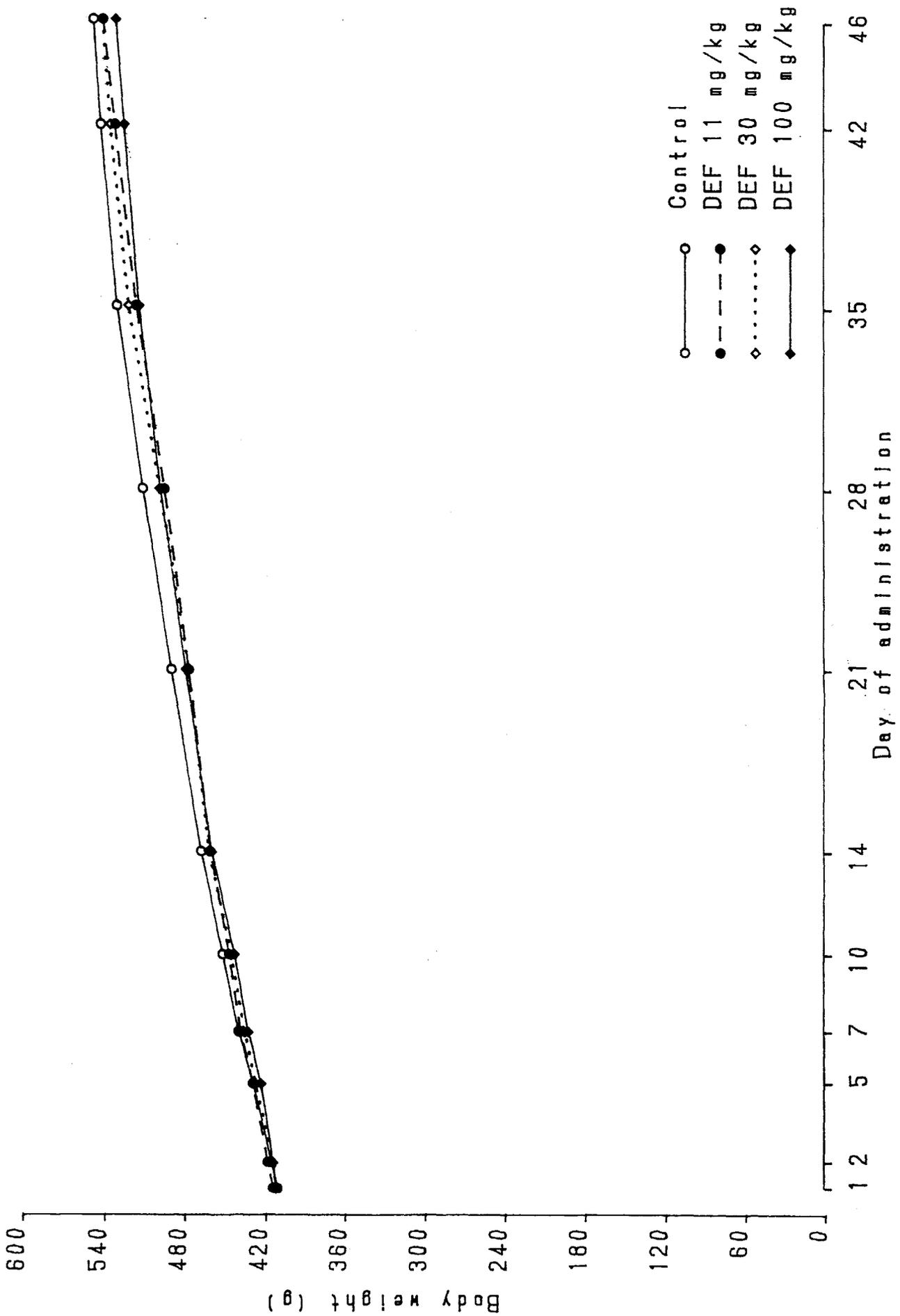


Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

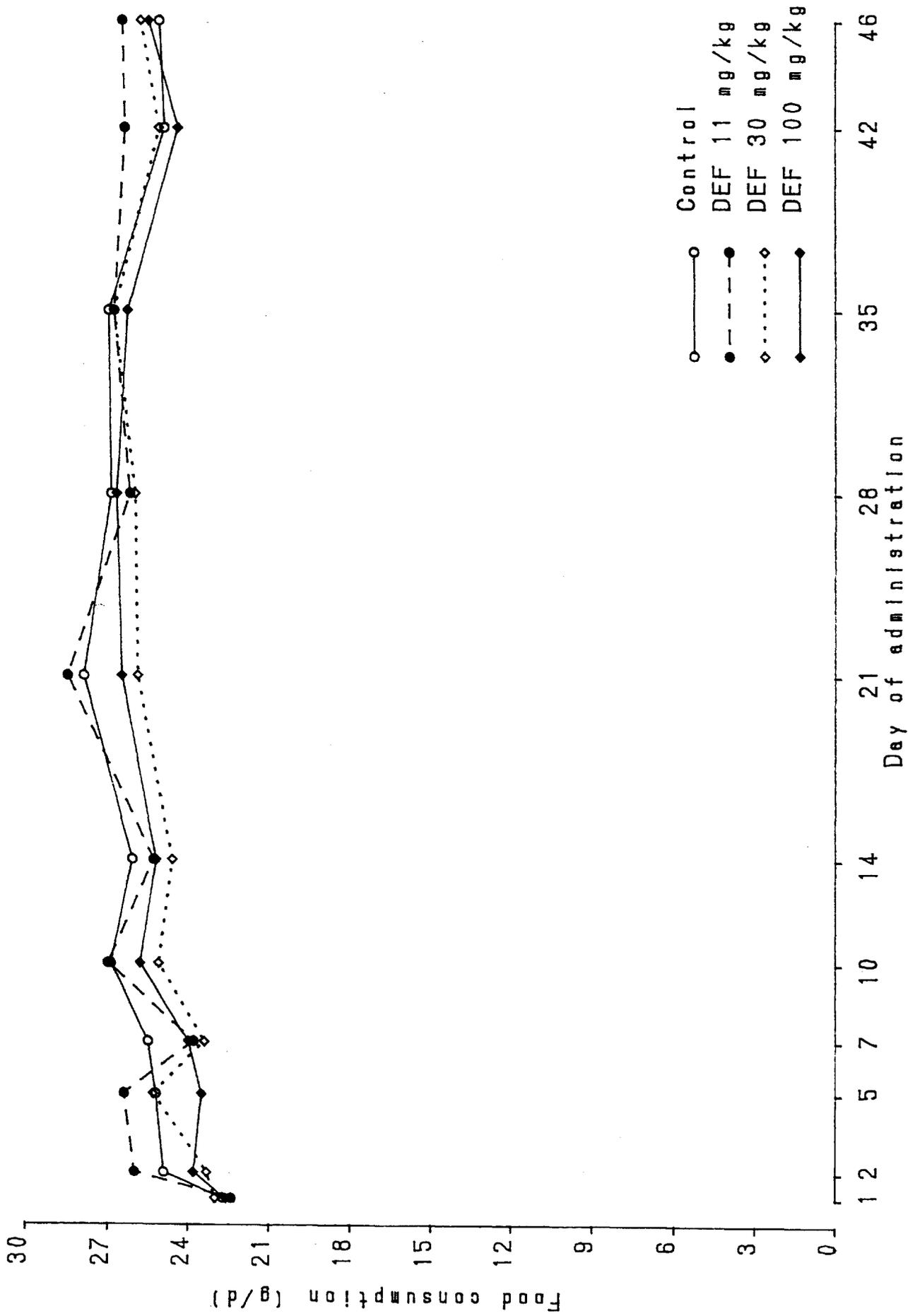


Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

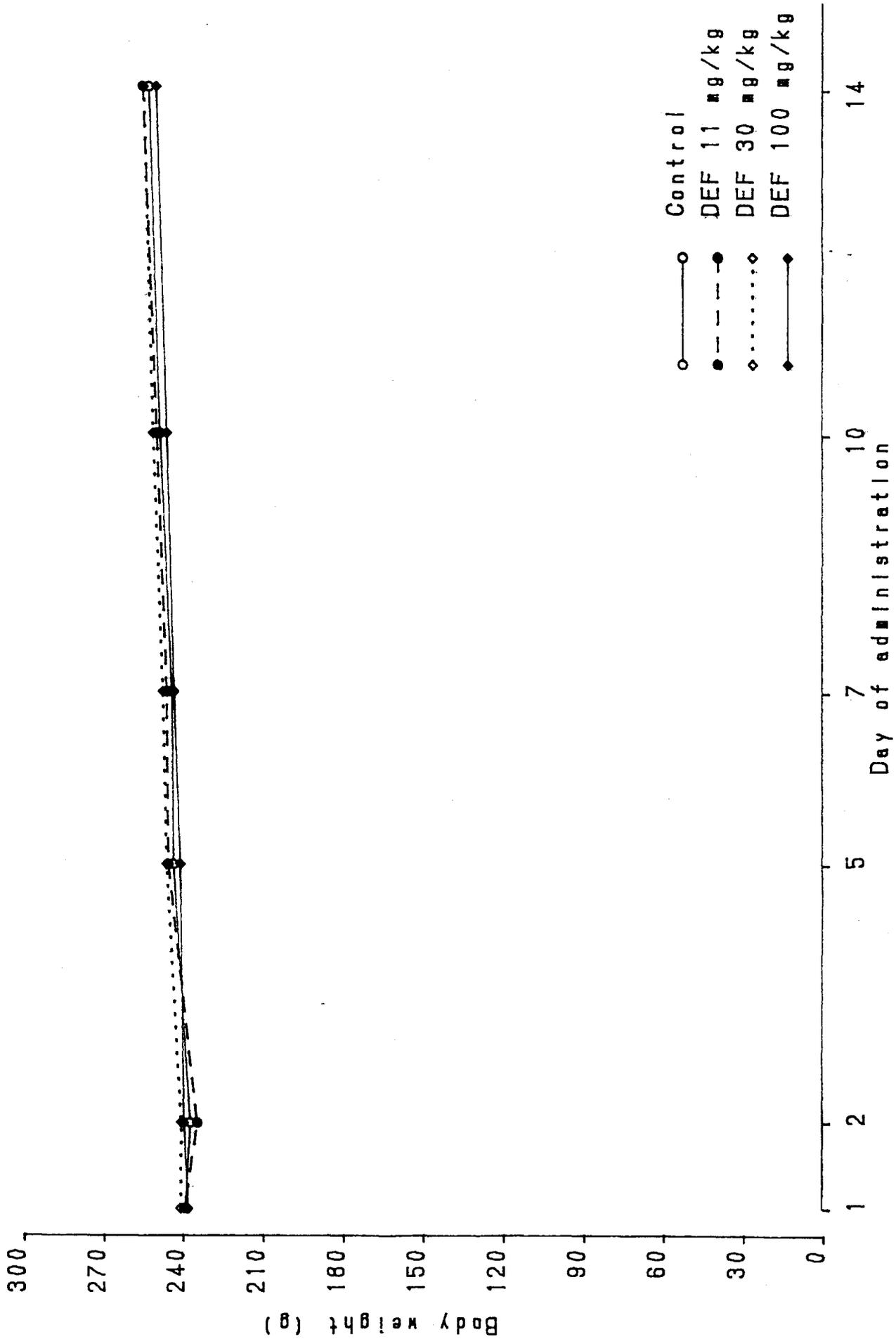


Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductivity/developmental toxicity study

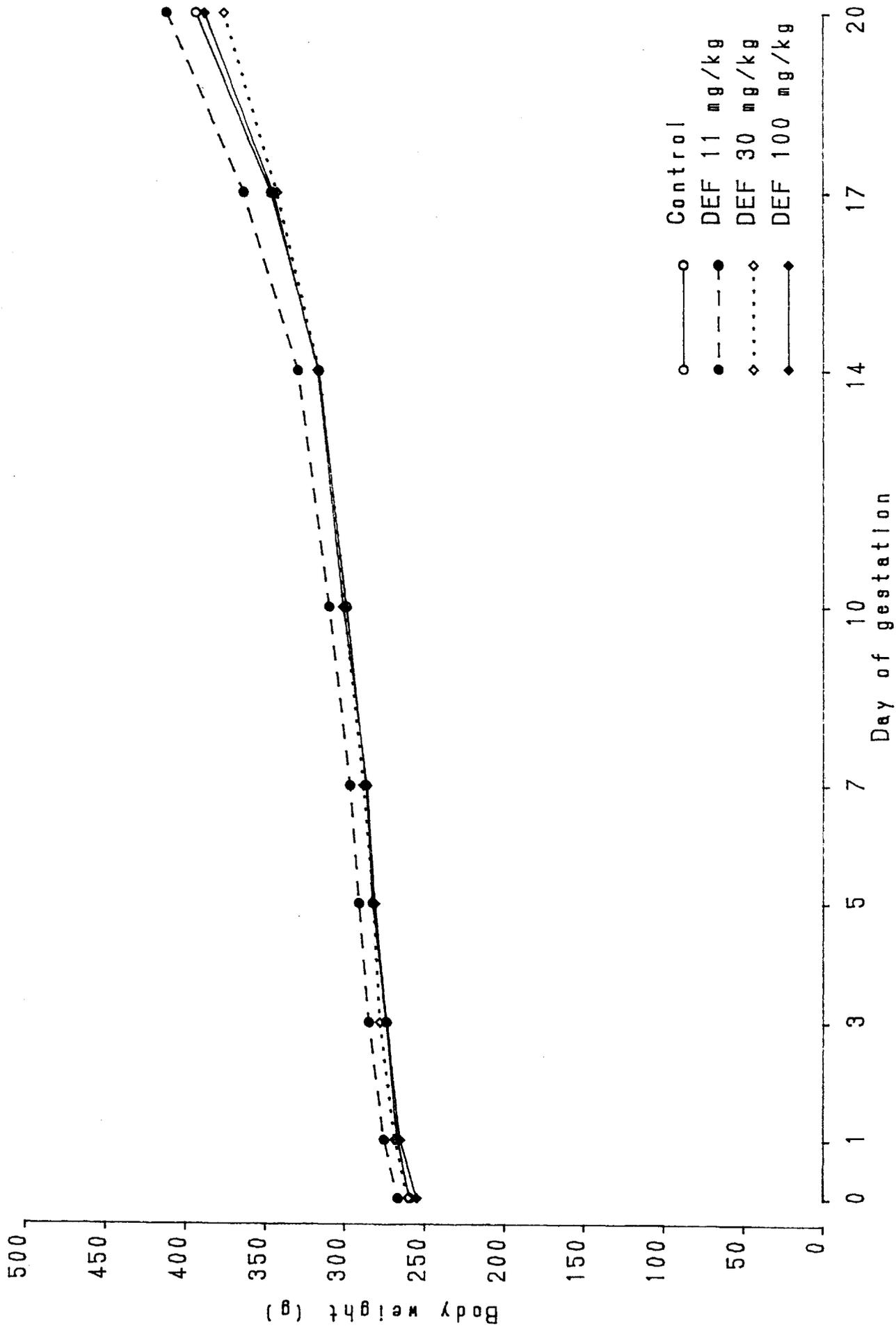


Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

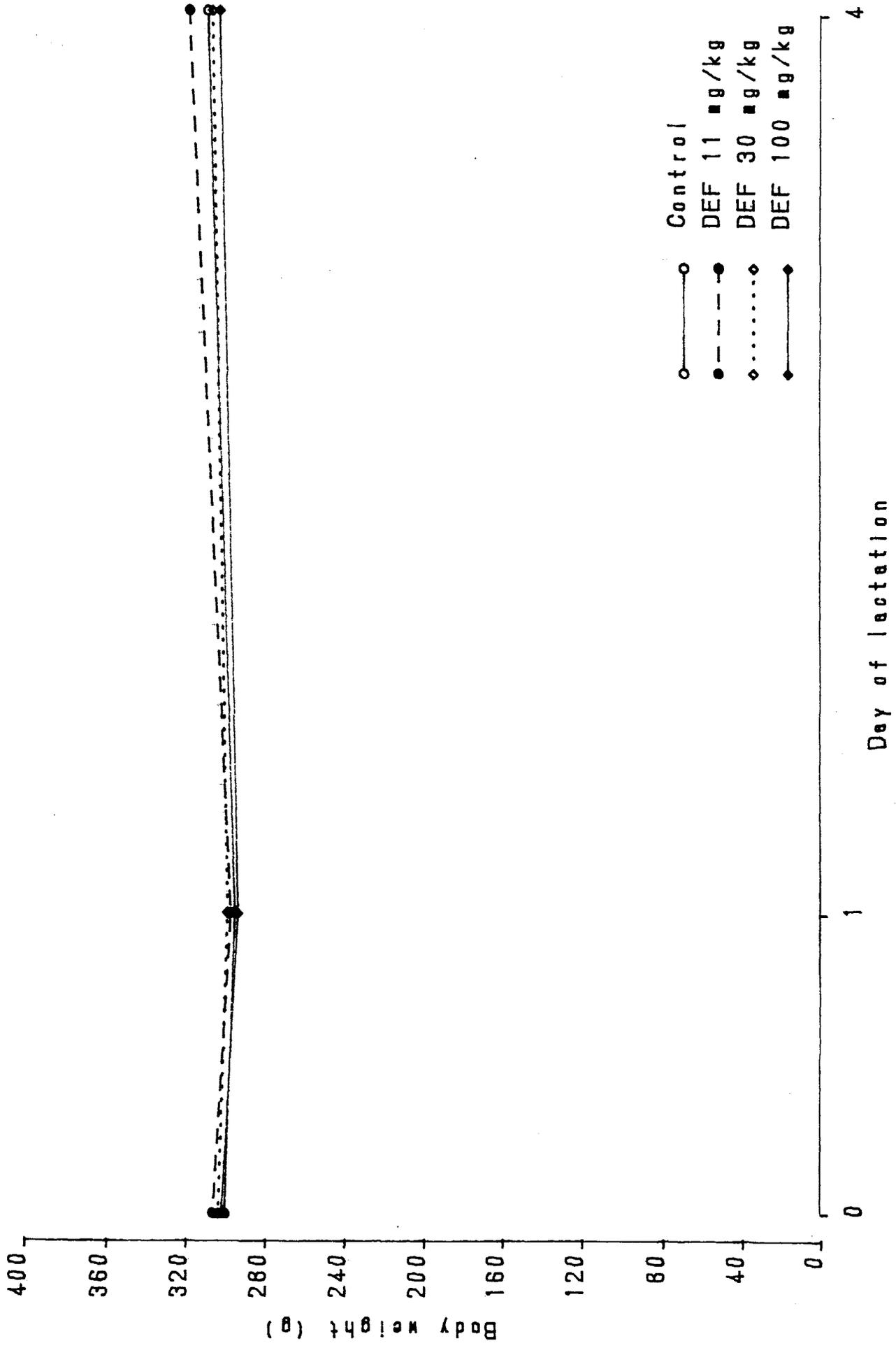


Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

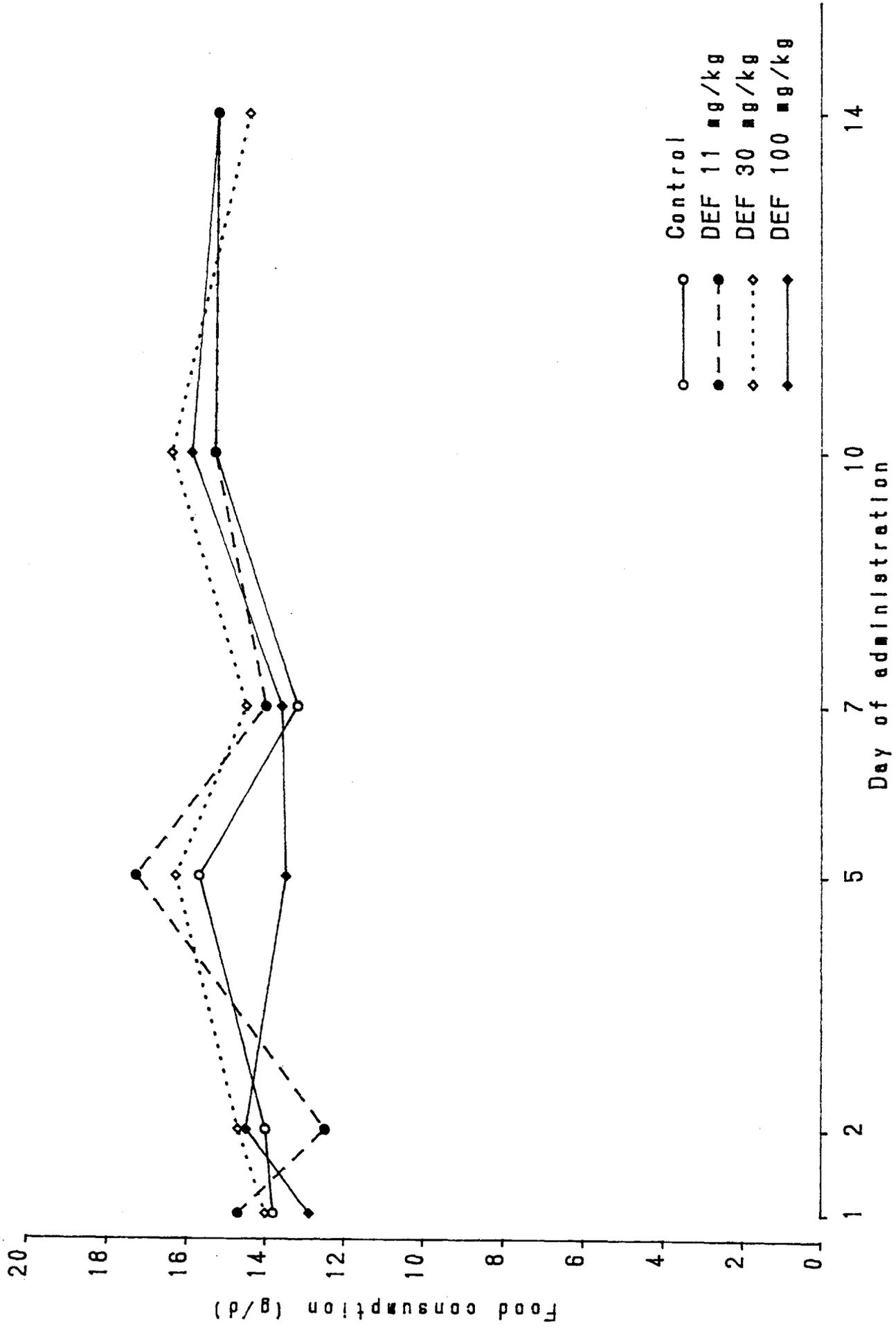


Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

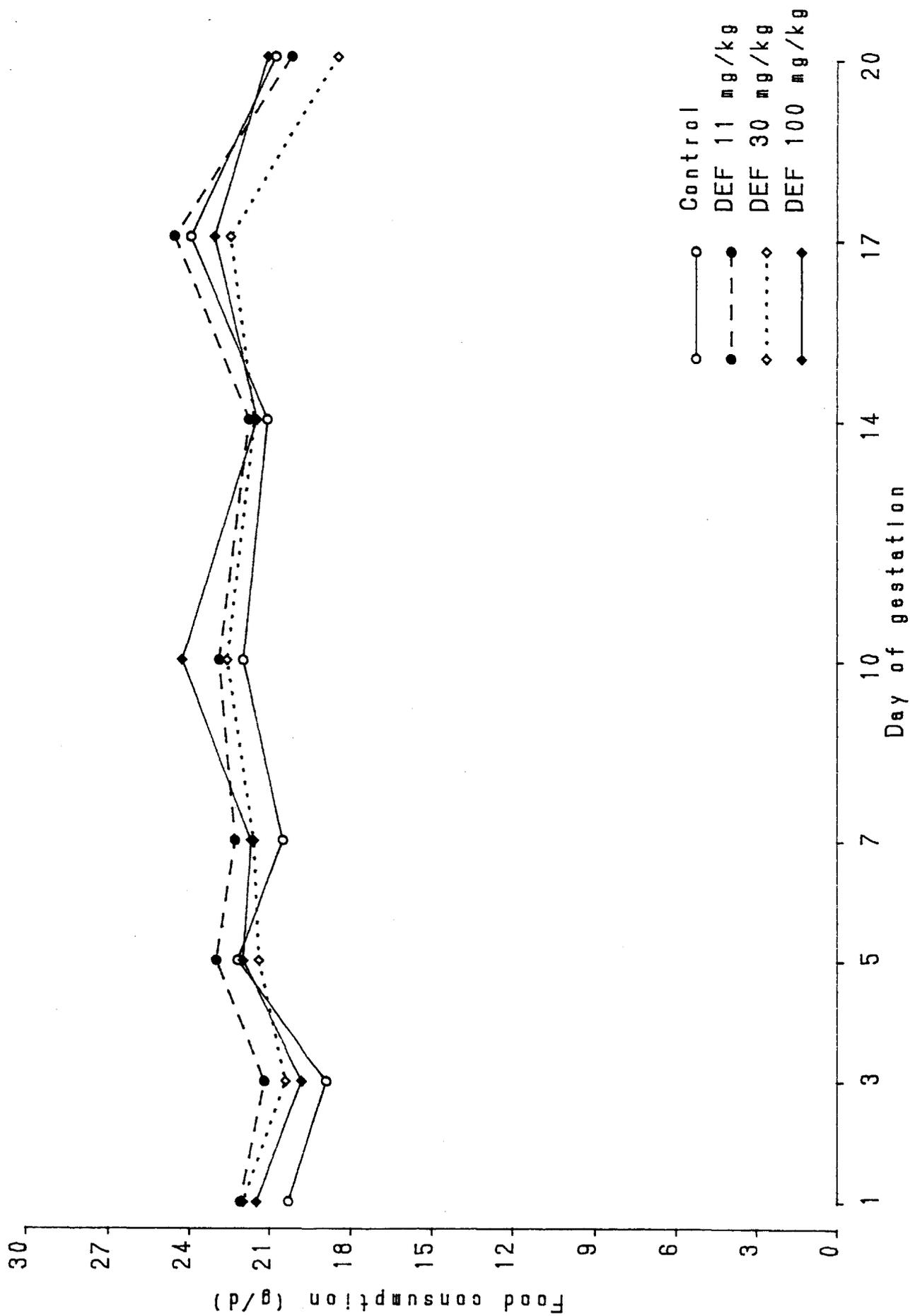


Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

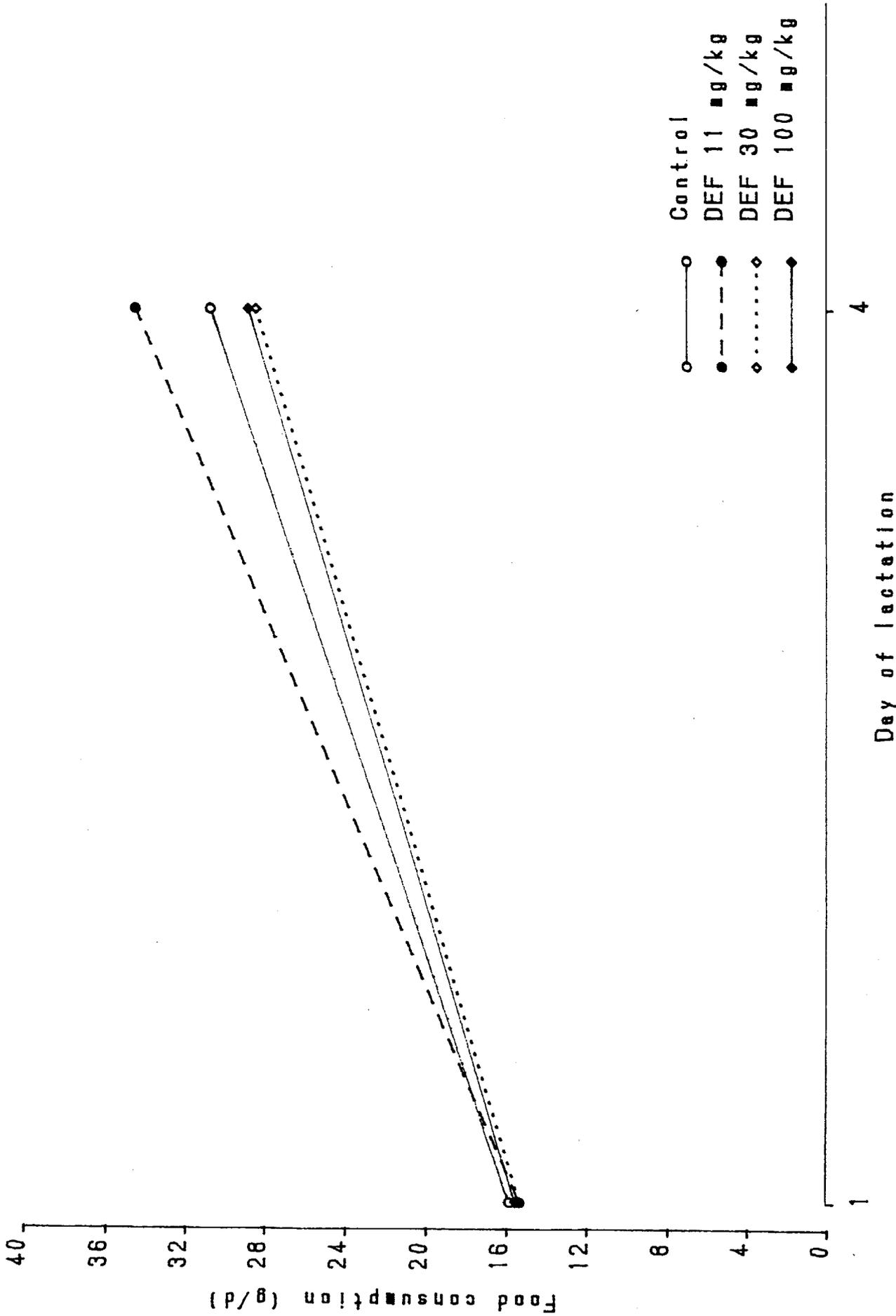


Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

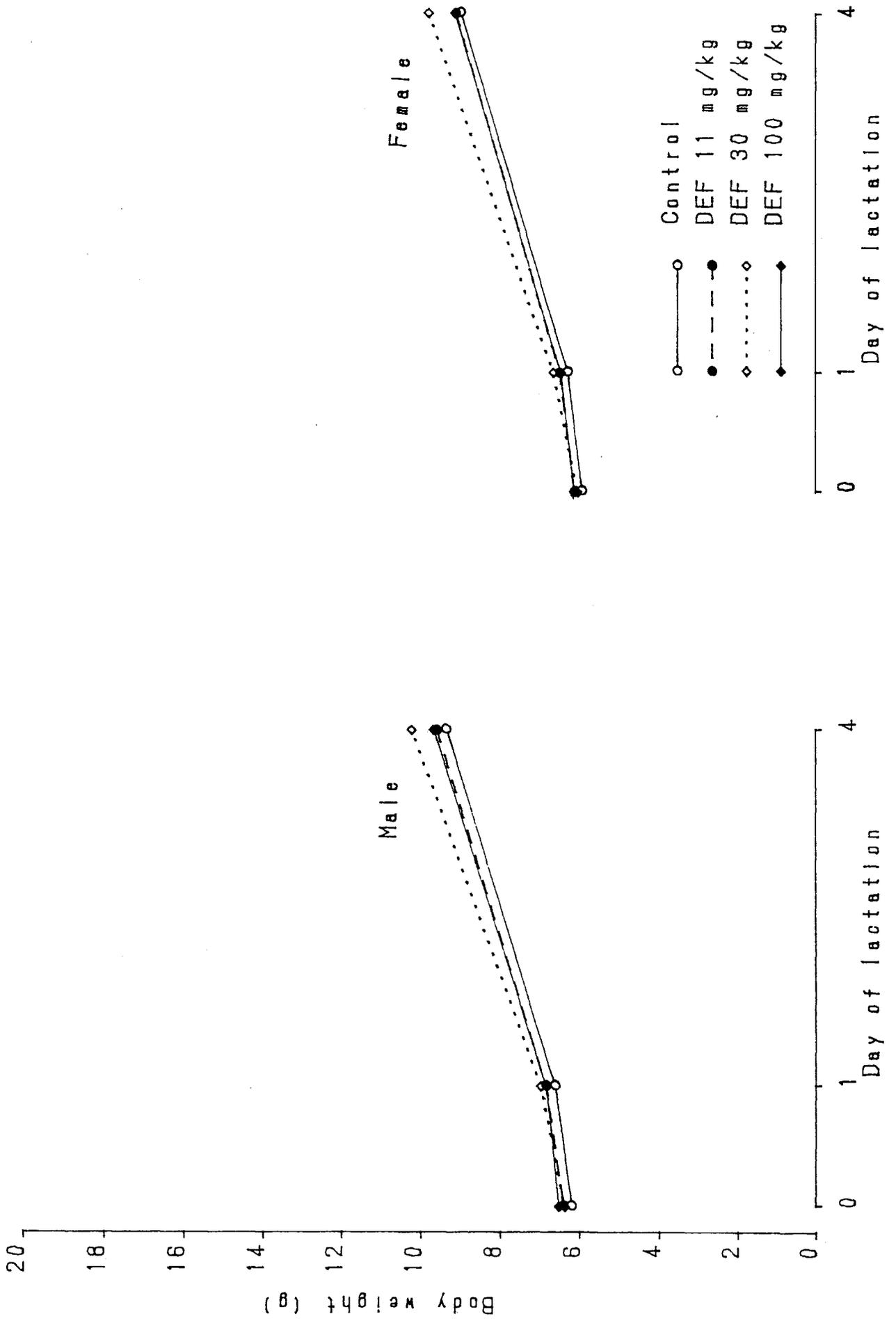


Figure 9. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductivity/developmental toxicity study of DEF in rats

Table 1. Experimental design for the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study of DEF in rats

Group	Concentration of DEF (w/v %)	Volume (mL/kg)	No. of animals <sup>a</sup>	
			Male	Female
<sup>b</sup> Control	0	0.095	12	12
DEF 11 mg/kg	100	0.010	12	12
DEF 30 mg/kg	100	0.028	12	12
DEF 100 mg/kg	100	0.095	12	12

a: DEF (diethyl fumarate) was dosed orally to male rats for 46 days included 14 days before mating and mating period, and to female rats from day 14 before mating to day 3 of lactation.

b: Control was purified water.

Table 2. General appearance of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Item	DEF (mg/kg)			
	Control	11	30	100
No. of animals examined	12	12	12	12
Abnormal findings	0 <sup>a</sup>	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.

Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	Day of administration											Body weight gain	
		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46	Day 1-46	% a
Control	12	b											137.583	33.398
		411.8	416.2	429.8	440.6	452.4	468.3	490.7	511.8	531.2	543.8	549.4	24.043	5.549
DEF 11 mg/kg	12	414.8	418.8	430.3	438.9	447.6	461.3	477.3	495.9	516.8	532.9	542.3	127.500	30.743
		15.4	15.5	16.5	16.9	18.0	21.5	22.1	22.8	24.8	26.9	29.4	22.549	5.334
DEF 30 mg/kg	12	412.8	414.9	428.2	436.3	446.0	462.5	477.4	499.3	522.4	536.4	542.5	129.667	31.437
		14.5	15.7	17.6	18.0	19.4	19.2	20.6	20.1	18.8	19.5	20.7	13.904	3.490
DEF 100 mg/kg	12	412.9	414.8	424.3	433.3	443.7	460.6	479.8	498.9	515.0	526.2	532.4	119.500	28.903
		14.3	14.7	19.5	19.6	21.6	23.4	23.4	26.2	30.5	31.2	33.6	25.865	5.814

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

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

Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	Day of administration										
		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46
Control	12	<sup>a</sup> 22.7	24.9	25.2	25.5	26.9	26.1	27.9	26.9	27.0	24.9	25.1
		3.1	3.1	3.3	2.7	3.0	3.0	2.9	3.6	3.9	3.3	4.0
DEF 11 mg/kg	12	22.4	26.0	26.4	23.8	27.0	25.3	28.5	26.2	26.8	26.4	26.5
		2.7	3.4	2.9	2.4	2.7	2.9	3.2	2.7	2.1	3.4	1.9
DEF 30 mg/kg	12	23.0	23.3	25.3	23.4	25.1	24.6	25.9	26.0	26.8	25.1	25.8
		2.4	3.0	3.0	3.3	3.0	2.1	2.1	3.1	2.6	1.7	1.9
DEF 100 mg/kg	12	22.6	23.8	23.5	24.0	25.8	25.2	26.5	26.7	26.3	24.4	25.5
		2.8	3.1	3.9	3.3	4.1	4.0	4.0	2.1	3.8	2.5	2.3

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

Table 5. Urinary findings of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	pH				Pro				Glu	Ket	Uro	Bil	Occult blood		
		7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++	-	-	0.1 EU/dL	-	-	++	+++
Control	5	0 <sup>a</sup>	0	4	1	1	0	3	1	5	5	5	5	5	0	0
DEF 11 mg/kg	5	1	1	1	2	1	3	1	0	5	5	5	5	3	1	1
DEF 30 mg/kg	5	1	0	1	3	1	2	2	0	5	5	5	5	5	0	0
DEF 100 mg/kg	5	0	0	4	1	0	5	0	0	5	5	5	5	5	0	0

Urinary sediments

Group	No. of animals	Urinary sediments														
		RBC		WBC		Epithelial cell				Specific gravity						
		-	±	-	±	Squamous	Round	Small round	Others	1.021-1.030	1.031-1.040	1.041-1.050	1.050<			
Control	5	5	0	5	0	4	1	5	5	5	5	5	1	2	1	1
DEF 11 mg/kg	5	5	0	4	1	5	0	5	5	5	5	5	0	2	1	2
DEF 30 mg/kg	5	5	0	5	0	5	0	5	5	5	5	5	0	0	2	3
DEF 100 mg/kg	5	5	0	5	0	4	1	5	5	5	5	5	1	3	1	0

(continued)

Table 5. (continued)

Group	No. of animals	U-Vol ml/21hr	U-Na mEq/21hr	U-K mEq/21hr	U-Cl mEq/21hr	Water consumption g/21hr
Control	5	<sup>b</sup> 15.40	0.8324	2.5256	1.1140	20.6
		3.49	0.4040	0.8043	0.7208	10.8
DEF 11 mg/kg	5	12.40	0.8836	2.7386	1.1726	15.4
		2.56	0.7277	1.0101	0.9315	12.0
DEF 30 mg/kg	5	10.00*	0.8338	2.7854	1.2420	14.2
		1.84	0.5127	0.7809	0.6041	7.7
DEF 100 mg/kg	5	19.90	0.8322	2.7240	1.1068	27.8
		9.22	0.2818	0.5770	0.2906	10.3

a: Values are no. of animals with findings.

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

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

Table 6. Hematological findings of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	RBC	Ht.	Hb.	MCV	MCH	MCHC	WBC	Plat
		10 <sup>6</sup> /μl	%	g/dl	fl	pg	%	10 <sup>3</sup> /μl	10 <sup>3</sup> /μl
Control	12	9.201 <sup>a</sup>	49.53	15.85	53.89	17.20	31.98	12.20	1120.2
		0.467	1.83	0.57	1.53	0.80	0.96	3.92	128.9
DEF 11 mg/kg	12	8.862	48.00	15.70	54.23	17.70	32.68	12.44	1110.4
		0.411	2.00	0.46	2.17	0.76	1.02	2.60	89.1
DEF 30 mg/kg	12	8.726**	48.68	15.99	55.85*	18.30**	32.81	11.63	1155.3
		0.273	1.54	0.54	2.81	1.02	0.86	2.76	100.8
DEF 100 mg/kg	12	9.042	48.78	16.08	53.94	17.73	32.92*	12.88	1083.9
		0.294	1.78	0.57	1.04	0.58	0.71	4.08	69.6

Group	No. of animals	Hemogram of WBC										
		Ret %	CT sec.	PT sec.	APTT sec.	Neutro.		Eos. %	Bas. %	Mono. %	Lymp. %	Others %
						Stab. %	Seg. %					
Control	12	15.4	239.4	13.18	28.88	0.3	17.8	0.9	0.0	0.0	80.9	0.0
		2.5	48.5	0.49	1.94	0.5	6.7	0.8	0.0	0.0	6.9	0.0
DEF 11 mg/kg	12	16.8	216.3	13.27	28.19	0.3	17.1	1.2	0.0	0.0	81.5	0.0
		2.6	55.4	0.61	2.44	0.5	5.5	0.9	0.0	0.0	5.5	0.0
DEF 30 mg/kg	12	17.0	236.4	13.26	27.85	0.3	16.2	1.2	0.0	0.0	82.3	0.0
		1.5	70.6	0.85	2.12	0.5	4.9	0.9	0.0	0.0	4.8	0.0
DEF 100 mg/kg	12	15.7	265.1	14.26	28.39	0.4	19.4	1.0	0.0	0.0	79.2	0.0
		1.6	62.4	1.41	3.16	0.5	7.8	0.9	0.0	0.0	7.8	0.0

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

\*: Differs from control, p<0.05.

\*\* : Differs from control, p<0.01.

Table 7. Biochemical findings of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	TP g/dl	Alb g/dl	A/G	Protein fractions (%)					GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	CHE IU/L	$\gamma$ -GTP IU/L	T-Bil mg/dl	Glu mg/dl
					Alb	Globulin										
						$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$							
Control	12	6.32 <sup>a</sup>	2.53	0.664	47.91	21.33	6.63	16.88	7.24	118.8	32.0	206.4	82.0	1.48	0.10	156.4
		0.15	0.08	0.036	1.34	1.44	0.93	0.91	0.88	15.9	5.1	41.2	13.6	0.55	0.00	19.8
DEF 11 mg/kg	12	6.24	2.50	0.665	48.42	21.98	6.46	16.12	7.03	119.3	32.2	217.1	88.6	1.55	0.10	149.7
		0.16	0.07	0.039	2.01	1.21	0.82	0.98	1.14	17.7	9.0	58.6	20.0	0.43	0.00	17.1
DEF 30 mg/kg	12	6.31	2.49	0.649	48.46	21.82	6.74	16.26	6.73	114.4	29.6	207.6	106.5*	1.75	0.10	151.2
		0.25	0.12	0.039	1.48	1.26	0.73	1.02	0.90	29.8	3.7	28.4	26.4	0.51	0.00	18.3
DEF 100 mg/kg	12	6.33	2.48	0.640	47.03	22.02	6.96	17.27	6.73	114.6	30.8	203.7	83.6	1.70	0.10	148.5
		0.21	0.11	0.032	1.20	1.27	0.80	1.05	0.83	26.1	4.8	36.4	21.1	0.35	0.00	8.7

Group	No. of animals	T-Cho mg/dl	TG mg/dl	PL mg/dl	BUN mg/dl	Crea mg/dl	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dl	P mg/dl
		13.6	36.3	15.1	2.36	0.06	1.51	0.181	0.9	0.18	0.61
DEF 11 mg/kg	12	73.8	80.7	129.8	19.13	0.53	143.00	4.478	104.5	9.58	6.75
		10.1	42.3	15.8	1.96	0.05	1.15	0.292	0.7	0.28	0.47
DEF 30 mg/kg	12	81.4	76.6	139.6	19.39	0.56	142.83	4.596	104.8	9.52	6.75
		20.9	20.9	28.8	1.75	0.07	1.05	0.235	1.3	0.21	0.35
DEF 100 mg/kg	12	72.3	67.1	130.7	19.69	0.54	143.75	4.549	105.2	9.50	6.61
		11.7	26.4	22.3	2.68	0.05	1.45	0.210	0.9	0.23	0.68

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

\*: Differs from control, p<0.05.

Table 8. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	Body weight g	Liver		Thymus		Kidney				Adrenal			
			g	%	mg	10 <sup>-3</sup> %	Right		Left		Right		Left	
							g	%	g	%	mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %
Control	12	518.2 <sup>a</sup>	13.679	2.638	308.8	59.714	1.538	0.298	1.523	0.294	25.5	4.941	28.6	5.548
		33.4	1.472	0.212	66.6	12.896	0.111	0.019	0.119	0.023	3.2	0.706	2.8	0.749
DEF 11 mg/kg	12	509.6	13.761	2.700	301.6	59.463	1.639	0.323	1.653	0.327**	27.4	5.382	30.4	5.986
		28.9	1.375	0.195	55.9	12.227	0.143	0.032	0.135	0.033	3.9	0.719	6.2	1.244
DEF 30 mg/kg	12	514.3	14.138	2.747	287.3	55.884	1.610	0.313	1.600	0.312	27.0	5.260	28.9	5.628
		22.1	1.265	0.191	59.5	11.478	0.136	0.028	0.112	0.024	4.0	0.811	4.9	0.931
DEF 100 mg/kg	12	502.3	14.455	2.873*	311.7	62.409	1.711*	0.340**	1.681*	0.335**	26.9	5.370	29.4	5.861
		31.9	1.561	0.151	68.6	14.428	0.183	0.024	0.181	0.021	4.0	0.803	4.3	0.821

Group	No. of animals	Testis				Epididymis			
		Right		Left		Right		Left	
		g	%	g	%	g	%	g	%
Control	12	1.613	0.312	1.613	0.312	0.606	0.118	0.601	0.115
		0.204	0.044	0.190	0.039	0.052	0.013	0.048	0.012
DEF 11 mg/kg	12	1.701	0.334	1.671	0.328	0.611	0.122	0.594	0.117
		0.087	0.016	0.107	0.023	0.049	0.011	0.048	0.010
DEF 30 mg/kg	12	1.728	0.338	1.714	0.334	0.650	0.128	0.643*	0.127*
		0.084	0.023	0.077	0.025	0.028	0.008	0.027	0.008
DEF 100 mg/kg	12	1.678	0.335	1.658	0.330	0.629	0.125	0.612	0.123
		0.149	0.031	0.118	0.023	0.053	0.011	0.034	0.010

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

\*: Differs from control, p<0.05.

\*\* : Differs from control, p<0.01.

Table 9. Gross findings of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Item	Control	DEF (mg/kg)		
		11	30	100
No. of animals examined	12	12	12	12
Forestomach : Thickening of mucosa	<sup>a</sup> 0	0	3	12
Edema in submucosa	0	0	1	0
Partial red discoloration of mucosa	0	0	1	2
Glandular stomach : Submucosal white mass	1	0	0	0
Epididymis (right) : Partial yellowish white discoloration	0	0	0	1

a: Values are no. of animals with findings.

Table 10. Histopathological findings of male rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Item	Grade <sup>a</sup>	Control	DEF (mg/kg)		
			11	30	100
No. of animals examined		12	12	12	12
Forestomach : Edema in submucosal tissue	+	0 <sup>b</sup>	0	1	0
Thickening of mucosal layer	+	0	7	11	4
	++	0	0	0	7
	+++	0	0	0	1
Vesiculation in superficial zone of mucosal layer	+	0	0	1	2
Hyperkeratosis	+	0	2	10	4
	++	0	0	0	8
Liver : Focal hyperplasia of bile ducts	+	0	0	1	0
Kidney (right) : Hyaline droplets deposition in tubular epithelium	+	3	2	1	0
Eosinophilic body deposition in tubular epithelium	+	3	2	1	0
Regeneration of tubular epithelium	+	0	1	1 <sup>c</sup>	0
Fibrosis	+	0	1	0	0
Kidney (left) : Hyaline droplets deposition in tubular epithelium	+	3	2	1	0
Eosinophilic body deposition in tubular epithelium	+	3	2	1	0
Regeneration of tubular epithelium	+	0	1	0	0
Fibrosis	+	0	1	0	0
Heart : Focal infiltration of cells, mainly histiocytic cells	+	0	0	0	1
Lung : Focal congestion	+	0	0	0	1
Calcium deposition in blood-vessel wall	+	4	7	3	5
Pituitary gland : Ciliated epithelial cyst	+	1	0	0	1
Glandular stomach : Squamous epithelial cyst	+	1	0	0	0
Testes : Atrophy of tubules	+	0	0	1	0
Epididymis (right) : Spermatic granuloma	+	0	0	0	1
Prostate : Interstitial infiltration of cells, mainly lymphocytes	+	2	4	2	3

There were no abnormal findings in the spleen, cerebrum, cerebellum, thyroid, thymus, adrenal, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon and rectum.

a: + = slight, ++ = moderate and +++ = severe changes.    b: Values are no. of animals with findings.    c: Focal.

Table 11. General appearance of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Item	Control	DEF (mg/kg)		
		11	30	100
<hr/>				
<Before gestation period>				
No. of animals examined	12	12	12	12
Abnormal findings	0 <sup>a</sup>	0	0	0
<Gestation period>				
No. of animals examined	12	12	12	12
Bleeding from vagina	0	0	1	0
Pale discoloration of forefeet, feet, auricles and eyeballs	0	0	1	0
<Lactation period>				
No. of animals examined	11	10	10	10
Abnormal findings	0	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.

Table 12. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	Day of administration						Body weight gain	
		1	2	5	7	10	14	Day 1-14	% a
Control	12	b							
		239.2	237.5	243.9	244.5	249.0	253.4	14.250	5.928
		9.6	10.6	10.2	11.6	12.2	12.5	3.519	1.306
DEF 11 mg/kg	12	239.5	234.8	245.9	246.4	250.2	255.8	16.333	6.784
		8.2	8.6	9.1	10.0	11.6	14.2	8.937	3.552
DEF 30 mg/kg	12	241.0	240.8	246.4	247.9	251.6	255.4	14.417	5.996
		10.1	10.6	11.0	11.7	11.2	11.7	6.585	2.750
DEF 100 mg/kg	12	238.2	239.8	241.3	243.6	246.5	250.6	12.417	5.185
		11.0	10.6	11.3	12.3	13.6	13.9	5.265	2.178

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

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

Table 13. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	Day of gestation									Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	17	20	Day 0-20	% a
Control	11	b										
		259.5 13.7	267.2 15.3	274.3 16.3	282.9 14.9	287.1 17.5	299.6 16.4	316.8 17.5	347.0 20.6	394.5 20.2	135.000 11.550	52.086 4.422
DEF 11 mg/kg	10	266.8 15.4	275.6 14.8	285.3 17.8	291.4 15.8	297.0 18.3	310.0 19.9	330.0 21.3	364.5 24.9	412.7 29.5	145.900 25.305	54.851 10.007
		260.6 11.5	268.8 12.3	278.1 16.0	282.5 15.7	288.9 16.8	300.8 19.3	316.8 23.0	343.5 27.5	376.7 41.8	116.091 38.140	44.512 14.125
DEF 100 mg/kg	11	255.2 14.4	265.4 14.1	273.7 16.6	281.4 18.0	286.5 18.2	301.5 21.3	317.5 23.0	345.8 24.6	389.0 33.3	133.818 23.349	52.347 7.903

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

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

Table 14. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	Day of lactation			Body weight gain	
		0	1	4	Day 0-4	% a
Control	11	b			9.182	3.150
		300.9 21.5	295.5 22.4	310.1 22.1	14.736	4.825
DEF 11 mg/kg	10	306.8	297.7	319.2	12.400	4.377
		25.9	24.7	15.9	12.834	5.014
DEF 30 mg/kg	10	304.2	299.4	307.6	3.400	1.331
		23.8	19.6	17.4	14.668	4.691
DEF 100 mg/kg	10	302.5	294.1	304.2	1.700	0.596
		19.6	23.0	19.7	8.233	2.775

a:  $(\text{Body weight gain} / \text{body weight on day 0}) \times 100$ .

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

Table 15. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	Day of administration					
		1	2	5	7	10	14
Control	12	a					
		13.8	14.0	15.7	13.2	15.3	15.2
		1.4	1.5	2.0	2.1	1.8	2.2
DEF 11 mg/kg	12	14.7	12.5	17.3	14.0	15.3	15.2
		1.6	2.3	1.6	2.9	2.5	2.4
DEF 30 mg/kg	12	14.0	14.7	16.3	14.5	16.4	14.4
		1.8	2.7	2.7	2.0	2.9	3.3
DEF 100 mg/kg	12	(11)b					
		12.9	14.5	13.5*	13.6	15.9	15.2
		2.5	4.1	1.8	2.2	2.5	2.3

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

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

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

Table 16. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	Day of gestation							
		1	3	5	7	10	14	17	20
Control	11	20.3 <sup>a</sup>	18.9	22.2	20.5	22.0	21.1	24.0	20.8
		2.1	2.7	3.0	2.8	2.6	2.1	3.2	3.3
DEF 11 mg/kg	10	22.1	21.2	23.0	22.3	22.9	21.8	24.6	20.2
		2.4	2.5	3.0	3.3	2.3	2.9	2.6	2.5
DEF 30 mg/kg	11	22.0	20.4	21.4	21.6	22.6	21.6	22.5	18.5
		3.0	3.5	3.1	3.1	3.8	3.6	2.8	3.8
DEF 100 mg/kg	11	21.5	19.8	22.0	21.7	24.3	21.5	23.1	21.1
		3.0	3.0	4.0	3.2	5.0	3.0	2.3	3.3

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

Table 17. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	Day of Lactation	
		1	4
Control	11	15.9 <sup>a</sup>	30.8
		8.4	5.8
DEF 11 mg/kg	10	15.4	34.6
		8.4	7.6
DEF 30 mg/kg	10	15.4	28.5
		5.4	5.5
DEF 100 mg/kg	10	15.6	28.9
		8.1	3.5

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

Table 18. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals	Body weight g	Liver		Thymus		Kidney				Adrenal				Ovary			
			g	%	mg	10 <sup>-3</sup> %	Right		Left		Right		Left		Right		Left	
							g	%	g	%	mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %	mg	10 <sup>-3</sup> %
Control	11	310.1 <sup>a</sup>	11.611	3.745	164.4	53.197	0.960	0.308	0.945	0.305	30.9	9.974	33.1	10.648	49.7	15.968	46.4	15.014
		22.1	1.240	0.296	20.8	7.218	0.092	0.021	0.086	0.021	5.1	1.462	6.3	1.724	8.7	2.048	4.6	1.764
DEF 11 mg/kg	10	319.2	12.412	3.897	142.7	44.600	0.997	0.311	0.983	0.308	32.5	10.199	34.4	10.768	53.9	16.882	53.5	16.646
		15.9	0.693	0.284	28.3	7.811	0.090	0.023	0.078	0.015	5.4	1.706	6.0	1.723	7.7	2.198	17.4	4.910
DEF 30 mg/kg	10	307.6	11.123	3.615	186.8	60.999	1.000	0.326	0.973	0.318	29.4	9.566	33.4	10.884	51.0	16.634	51.5	16.722
		17.4	1.245	0.338	82.5	27.288	0.045	0.020	0.054	0.024	5.1	1.652	6.4	2.162	6.8	2.440	8.5	2.382
DEF 100 mg/kg	10	304.2	12.499	4.118*	154.7	50.858	1.023	0.337*	1.003	0.329*	30.4	9.971	34.3	11.267	55.2	18.188	48.3	15.900
		19.7	0.938	0.327	61.7	20.420	0.080	0.023	0.067	0.021	4.5	1.144	5.3	1.588	6.4	2.130	7.0	2.242

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

\*: Differs from control, p<0.05.

Table 19. Gross findings of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Item	Control	DEF (mg/kg)			
		11	30	100	
No. of animals examined	12	12	12	12	
Forestomach : Thickening of mucosa	0 a	0	3 b	12	
Oviduct (right) : Dilation of lumen	0	0	1	0	
Uterus (right side) : Hypoplasia	0	0	1	0	
Existence of 1 dead fetus	0	0	1 c	0	
Vagina : Septum formation	0	0	0	1 d	
Existence of 1 dead fetus	0	0	0	1 d	

a: Values are no. of animals with findings.

b: Partial in one animal.

c: Killed on day 26 of gestation for delayed delivery. Observed 1 corpus luteum and 1 implantation site.

d: Killed on day 26 of gestation for delayed delivery. Observed 2 corpora lutea and 1 implantation site.

Table 20. Histopathological findings of female rats dosed orally with DEF in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Item	Grade <sup>a</sup>	Control	DEF (mg/kg)		
			11	30	100
No. of animals examined		12	12	12	12
Forestomach : Ulcer	++	0 <sup>b</sup>	0	1	0
Focal edema in lamina propria mucosae	+	0	0	1	0
Thickening of mucosal layer	+	0	2	7	9
Hyperkeratosis	++	0	0	1	3
Thickening of lamina propria mucosae	+	0	0	4	9
Thickening of muscularis mucosae	++	0	0	1	2
Thymus : Atrophy	+	0	0	0	4
Atrophy of thymic medulla	++	0	0	1	0
Kidney (left): Focal atrophy of tubular epithelium, mainly distal tubules	+	0	0	0	1
Focal dilation of tubules, mainly distal tubules	+	0	0	0	1
Calcium deposition in renal pelvis mucosa	+	1	0	0	0
Lung : Calcium deposition in blood-vessel wall	+	1	2	2	1
Pituitary gland : Retention of homogeneous plasma-like substance in Rathke's pouch	+	2	0	2	1
Ovary (right) : Lutein cyst	+	0	0	0	1
Follicular cyst	+	0	0	0	1
Oviduct (right) : Dilation of lumen	+	- <sup>c</sup>	-	1(1)	-
Uterus (right side) : Hypoplasia	+	0(1) <sup>d</sup>	-	1(1)	0(1) <sup>e</sup>
Vagina : Septum formation	+	0(1)	-	-	1(1) <sup>e</sup>

There were no abnormal findings in the liver, spleen, heart, cerebrum, cerebellum, thyroid, adrenal, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon and rectum.

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

b: Values are no. of animals with findings.

c: - = not examined.

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

e: Killed on day 26 of gestation for delayed delivery. Observed 2 corpora lutea, 1 implantation site and 1 dead fetus in the vagina.

Table 21. Influence of DEF on reproductive ability of rats in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study

Group	No. of animals examined	Estrous cycle								No. of pairs mated	No. of pairs with successful copulation	Days between the starting of mating and copulation	Copulation index % <sup>a</sup>	No. of pregnant animals	Fertility index % <sup>b</sup>
		Before administration			Administration period			Normal	Abnormal						
		Normal	Abnormal		Normal	Abnormal									
			Total	Continuous diestrus		Irregular	Total								
Control	12	12	0	- <sup>c</sup>	-	12	0	-	-	12	12	2.2±1.3 <sup>d</sup>	100.0	11	91.7
DEF 11 mg/kg	12	12	0	-	-	12	0	-	-	12	12	2.8±1.4	100.0	10	83.3
DEF 30 mg/kg	12	12	0	-	-	12	0	-	-	12	12	2.4±1.5	100.0	11	91.7
DEF 100 mg/kg	12	12	0	-	-	12	0	-	-	12	12	1.5±0.8	100.0	11	91.7

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

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

c: - = blank value.

d: Values are means and S.D., and expressed in day.

Table 22. Influence of DEF on delivery and maternal behavior in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study in rats

Group		No. of pregnant females	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index % <sup>a</sup>	No. of pups born	Delivery index % <sup>b</sup>	Live pups born				Dead pups born			Gestation length day	Gestation index % <sup>e</sup>	Nursing index % <sup>f</sup>	
								No.	Live birth index % <sup>c</sup>	Sex ratio <sup>d</sup>	Male	Female	No.	Male				Female
Control	Total	11	178	162		149		147			64	83	2	1	1			
	Mean		16.2	14.7	91.713	13.5	92.054	13.4	98.416	1.486	5.8	7.5	0.2	0.5	0.5	21.8	100.0	100.0
	S.D.		1.7	0.9	8.615	1.3	7.803	1.6	3.527	0.809	2.0	1.9	0.4	0.7	0.7	0.4		
DEF 11 mg/kg	Total	10	174	161		154		149			78	71	5	3	2			
	Mean		17.4	16.1	94.477	15.4	95.539	14.9	97.083	1.276	7.8	7.1	0.5	1.0	0.7	22.0	100.0	100.0
	S.D.		3.5	1.6	11.872	2.0	6.154	1.7	5.487	1.155	3.2	2.7	1.0	1.0	0.6	0.0		
DEF 30 mg/kg	Total	11	(10) <sup>g</sup>	(10)		(10)		(10)			57	69	0	0	0	(10)	h	(10)
	Mean		18.2	13.5	75.037	12.6	94.524	12.6	100.000	1.255	5.7	6.9	0.0	0.0	0.0	22.0	90.9	100.0
	S.D.		4.8	5.1	24.892	4.6	6.750	4.6	0.000	0.586	1.9	3.3	0.0			0.0		
DEF 100 mg/kg	Total	11	(10)	(10)		(10)		(10)		i	71	60	4	2	2	(10)	j	(10)
	Mean		17.7	15.7	89.781	14.3	90.587	13.9	97.521	0.890	7.9	6.7	0.4	1.0	1.0	21.9	90.9	100.0
	S.D.		3.2	2.2	11.067	2.8	9.551	2.6	5.784	0.270	1.8	1.4	1.0	1.4	0.0	0.3		

a: (No. of implantation sites / no. of corpora lutea) x 100, using the litter as a unit of treatment.

b: (No. of pups born / no. of implantation sites) x 100, expressed in the same way as above.

c: (No. of live pups born / no. of pups born) x 100, expressed in the same way as above.

d: (No. of female pups / no. of male pups), expressed in the same way as above.

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

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

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

h: One animal had delayed delivery and was observed 1 corpus luteum, 1 implantation site and 1 dead fetus in the uterus.

i: Excluded one litter because of error in confirming male and female of pups.

j: One animal had delayed delivery and was observed 2 corpora lutea, 1 implantation site and 1 dead fetus in the vagina.

Table 23. Influence of DEF on viability of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study in rats

Group		No. of litters	No. of live pups born	Live pups on day 4			
				No.	Viability index % <sup>a</sup>	Male	Female
Control	Total	11	147	142		60	82
	Mean		13.4	12.9	96.775	5.5	7.5
	S.D.		1.6	1.6	6.372	1.3	1.9
DEF 11 mg/kg	Total	10	149	149	100.000	78	71
	Mean		14.9	14.9	0.000	7.8	7.1
	S.D.		1.7	1.7		3.2	2.7
DEF 30 mg/kg	Total	10	126	122		54	68
	Mean		12.6	12.2	96.527	5.4	6.8
	S.D.		4.6	4.5	6.186	2.0	3.2
DEF 100 mg/kg	Total	10	139	136		(9) <sup>b</sup>	(9) <sup>b</sup>
	Mean		13.9	13.6	98.031	69	59
	S.D.		2.6	2.5	3.185	7.7**	6.6
						1.6	1.3

a: (No. of live pups on day 4 / no. of live pups born) x 100, using the litter as a unit of treatment.

b: Excluded one litter because of error in confirming male and female of pups.

\*\* : Differs from control, p<0.01.

Table 24. General appearance of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study of DEF in rats

Item	Male				Female			
	Control	DEF (mg/kg)			Control	DEF (mg/kg)		
		11	30	100		11	30	100
No. of animals examined	<sup>a</sup> 64	78	57	<sup>b</sup> 71	83	71	69	<sup>b</sup> 60
<sup>c</sup> Death	<sup>d</sup> 4	0	3	2	1	0	1	1
Trauma of head and buccal region	0	0	0	1	0	0	0	0
Trauma of left thoracic region	0	0	0	0	1	0	0	0
Dark red discoloration of left buccal region	0	0	0	1	0	0	0	0
Milky white discoloration of lumbar and posterior abdominal region	1	0	0	0	0	0	0	0

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

b: Excluded one litter because of error in confirming male and female of pups.

c: Includes missing.

d: Values are no. of animals with findings.

Table 25. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study of DEF in rats

Group	No. of litters	Male					Female				
		Day of lactation			Body weight gain		Day of lactation			Body weight gain	
		0	1	4	Day 0-4	% a	0	1	4	Day 0-4	%
		b									
Control	11	6.19	6.60	9.35	3.164	50.990	5.93	6.28	8.99	3.064	51.594
		0.40	0.52	0.99	0.763	11.553	0.33	0.43	0.95	0.785	12.802
DEF 11 mg/kg	10	6.39	6.83	9.59	3.200	49.884	6.11	6.49	9.11	3.000	48.955
		0.38	0.50	0.94	0.643	8.561	0.36	0.45	0.94	0.704	10.395
DEF 30 mg/kg	10	6.36	6.96	10.22	3.860	60.044	6.05	6.65	9.80	3.750	61.075
		0.48	0.72	1.76	1.413	19.364	0.48	0.73	1.76	1.358	18.995
		c									
DEF 100 mg/kg	9	6.51	6.82	9.67	3.156	48.478	6.12	6.46	9.14	3.022	49.480
		0.40	0.45	0.76	0.525	7.936	0.50	0.53	0.75	0.393	6.508

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

b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram, using the litter as a unit of treatment.

c: Excluded one litter because of error in confirming male and female of pups.

Table 26. Gross findings of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity study of DEF in rats

Item	Male				Female			
	Control	DEF (mg/kg)			Control	DEF (mg/kg)		
		11	30	100		11	30	100
No. of dead animals <sup>a</sup>	4	3	1	3	2	2	0	2
Heart : Attachment of blood clot	0 <sup>b</sup>	0	0	0	1	0	- <sup>c</sup>	0
Lung (left) : Red discoloration	0	0	0	0	1	0	-	0
Cerebellum : Partial dark red discoloration	0	0	0	1	0	0	-	0
Skin of thoracic and dorsal region :								
Trauma	0	0	0	0	1	0	-	0
Perforation from left lateral thoracic trauma region to thoracic cavity	0	0	0	0	1	0	-	0
No. of animals killed on day 4 of lactation	60	78	54	69 <sup>d</sup>	82	71	68	59 <sup>d</sup>
Skin of left thoracic region : Trauma	0	0	0	0	1	0	0	0

a: Excludes missing.

b: Values are no. of animals with findings.

c: - = blank value.

d: Excluded one litter because of error in confirming male and female of pups.