

最終報告書

1,3-ジシアノベンゼンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験
(試験番号：10-034)

陳 述 書 (I)

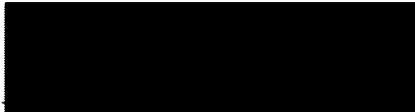
試験の表題

1, 3-ジシアノベンゼンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験
(試験番号：10-034)

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

試験責任者

安全性研究部 首席研究員



平成 23 年 3 月 23 日

陳 述 書 (Ⅱ)

試験の表題

1, 3-ジシアノベンゼンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

(試験番号 : 10-034)

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

試験責任者

安全性研究部 首席研究員



平成 23 年 3 月 23 日

試験の表題

1, 3-ジシアノベンゼンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

(試験番号：10-034)

試験委託者

名 称 厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

所 在 地 東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験実施施設

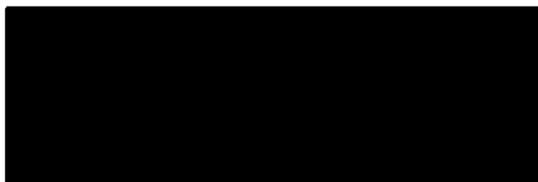
名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所

所 在 地 神奈川県相模原市緑区橋本台 3-7-11

運営管理者

試験責任者

信頼性保証責任者



試験日程

試験開始 平成 22 年 8 月 30 日

動物搬入 平成 22 年 9 月 2 日

実験開始 平成 22 年 9 月 14 日

投与開始 平成 22 年 9 月 15 日

交配開始 平成 22 年 9 月 29 日

児動物解剖開始 平成 22 年 10 月 26 日

雌親解剖開始 平成 22 年 10 月 26 日

雄親解剖 平成 22 年 10 月 27 日

実験終了 平成 23 年 2 月 22 日

試験終了 平成 23 年 3 月 23 日

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

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

ある事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

試験資料の保管

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

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

試験責任者の署名および試験担当者の業務分担

試験責任者

財団法人 畜産生物科学安全研究所
安全性研究部 首席研究員

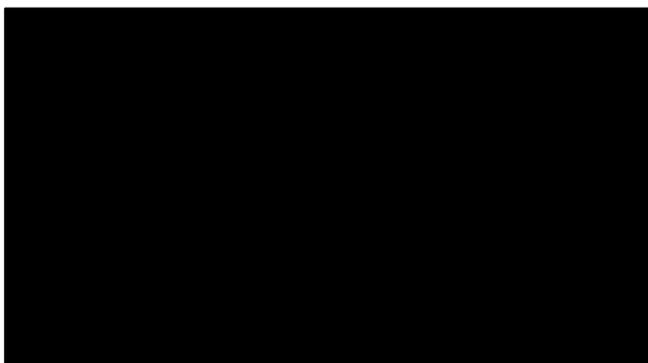
氏名



平成 23 年 3 月 23 日

試験担当者およびその業務分担

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



信頼性保証証明書

試験表題 : 1,3-ジシアノベンゼンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号 : 10-034

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
1. 試験計画書審査 平成22年08月31日	平成22年08月31日	平成22年08月31日
2. 試験計画書記載事項変更審査		
(変-1) 平成22年11月15日	平成22年11月15日	平成22年11月15日
(変-2) 平成23年01月12日	平成23年01月12日	平成23年01月12日
3. 試験実施状況査察		
動物導入 平成22年09月02日	平成22年09月03日	平成22年09月03日
検 疫 平成22年09月03日	平成22年09月03日	平成22年09月03日
群分け・個体識別・被験物質調製 平成22年09月14日	平成22年09月14日	平成22年09月14日
体重測定・餌測定・投与・症状観察 平成22年09月15日	平成22年09月15日	平成22年09月15日
交配開始 平成22年09月29日	平成22年09月30日	平成22年09月30日
交尾確認 平成22年09月30日	平成22年09月30日	平成22年09月30日
体重測定・餌測定・投与・症状観察 平成22年10月12日	平成22年10月12日	平成22年10月12日
分娩の確認 平成22年10月22日	平成22年10月22日	平成22年10月22日
被験物質調製 平成22年10月26日	平成22年10月26日	平成22年10月26日
解剖(雄・雌・新生児・死亡新生児)・病理組織標本作製(臓器・組織の固定) 平成22年10月27日	平成22年10月27日	平成22年10月27日
病理組織標本作製(切り出し) 平成22年12月10日	平成22年12月10日	平成22年12月10日

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
病理組織標本作製(包埋・薄切) 平成22年12月17日	平成22年12月17日	平成22年12月17日
病理組織標本作製(染色) 平成22年12月28日	平成22年12月28日	平成22年12月28日
4. 生データ査察 平成23年03月07日	平成23年03月07日	平成23年03月07日
5. 報告書(草案)審査 平成23年03月08日 ～ 同年03月09日	平成23年03月09日	平成23年03月09日
6. 最終報告書審査 平成23年03月23日	平成23年03月23日	平成23年03月23日

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

平成 23 年 3 月 23 日
財団法人 畜産生物科学安全研究所

信頼性保証責任者



目 次

要約	1 頁
目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 動物および飼育条件	2
3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法	3
4. 観察および検査	4
1) 親動物に関する項目	4
(1) 一般状態	4
(2) 体重および摂餌量	4
(3) 雌の性周期検査	4
(4) 交配および分娩状態観察	5
(5) 剖検および器官重量	5
(6) 病理組織学検査	5
2) 新生児に関する項目	6
(1) 産児数、性比および外表観察	6
(2) 一般状態・生児数	6
(3) 体重	6
(4) 病理学検査	6
5. 統計解析	6
結果	8
1. 反復投与毒性	8
1) 一般状態および死亡	8
2) 体重	8
3) 摂餌量	8
4) 剖検	8
5) 器官重量	9
6) 病理組織学検査	9

2. 生殖発生毒性	10
1) 親動物に及ぼす影響	10
(1) 性周期検査	10
(2) 交尾率および受胎率	10
(3) 黄体数、着床数および着床率	11
(4) 妊娠期間および出産率	11
(5) 分娩および哺育状態	11
2) 新生児に及ぼす影響	11
(1) 生存性および体重	11
(2) 病理学検査	11
考察	13
文献	15
添付資料	
A 図・群別平均値表	
Figures 1、2	体重 1
Figures 3、4	摂餌量 3
Tables 1、2	死亡率 5
Tables 3、4	一般状態 7
Tables 5、6	体重 9
Tables 7、8	摂餌量 11
Tables 9、10	剖検 13
Tables 11、12	器官重量 15
Tables 13、14	病理組織学検査 17
Table 15	生殖に及ぼす影響 21
Table 16	新生児に及ぼす影響 22
Table 17	新生児の外表所見 23
Table 18	新生児の内臓所見 24
B. 個体別表等	
Appendix 1	被験物質の特性 1

Appendix 2	被験物質の投与形態での安定性	3
Appendix 3	投与液中の被験物質濃度の確認	4
Appendix 4	動物室の温度湿度の測定結果	5
Appendix 5	飼料の汚染物質分析	7
Appendix 6	床敷の汚染物質分析	19
Appendix 7	飲料水の水質検査	21
Appendices 8、9	死亡率	22
Appendices 10、11	一般状態	30
Appendices 12、13	体重	34
Appendices 14、15	摂餌量	38
Appendices 16、17	剖検・病理組織学検査	42
Appendices 18～21	器官重量	57
Appendices 22、23	性周期	65
Appendix 24	生殖に及ぼす影響	71
Appendix 25	新生児に及ぼす影響	75
Appendix 26	新生児の外表所見	79
Appendix 27	新生児の内臓所見	83
Photos 1～6	病理組織写真	87

要 約

化学産業の分野において、農薬やメタキシリレンジアミンの原料として使用されている 1,3-ジシアノベンゼン¹⁾ の 0、6、25 および 100 mg/kg/day を、1 群雌雄各 12 匹の SD 系ラットに、交配開始 2 週間前から、雄は 42 日間、雌は分娩後哺育 4 日（42～56 日間）まで経口投与し、その生殖毒性を調べた。なお、全児死亡が認められた母動物の 4 匹中 3 匹については、哺育 3 日までの投与とした。

1. 反復投与毒性

100 mg/kg 群で雌雄に体重増加抑制、雌で哺育期間中の摂餌量の低値が認められた。器官重量では、25 mg/kg 群で雄に肝臓の絶対および相対重量の高値、雌に肝臓相対重量の高値、100 mg/kg 群で雄に肝臓および腎臓の絶対および相対重量の高値、雌に肝臓相対重量の高値が認められた。病理組織学検査では、100 mg/kg 群で雌雄に小葉中心性肝細胞肥大、25 および 100 mg/kg 群で雄の腎臓に近位尿細管上皮の PAS 反応陰性で $\alpha_2\mu$ -グロブリン免疫染色陽性の硝子滴の増加が認められた。

2. 生殖発生毒性

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

児動物については、100 mg/kg 群で生児総数、出生率、生存率および体重に有意な低値が認められた。総出産児数、分娩率、性比および形態には、投与に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、1,3-ジシアノベンゼンの親動物への反復投与において、25 mg/kg 群で雌雄に肝臓重量の高値、100 mg/kg 群で雌雄に小葉中心性肝細胞肥大が認められたことから、反復投与毒性における無影響量（NOEL）は雌雄とも 6 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL は、親動物に対しては、毒性影響が認められなかったことから、100 mg/kg/day、児動物に対しては、100 mg/kg 群で生児数、体重、出生率および生存率に低値が認められたことから、25 mg/kg/day と推定した。

目 的

1, 3-ジシアノベンゼンをラットに反復経口投与し、本物質の生殖毒性を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質である 1, 3-ジシアノベンゼンは、水に溶けにくい白色粉末で、試験には、東京化成工業株式会社（東京都中央区日本橋 4-10-2）から購入したロット番号 XJ5VC（純度 99.9%）の試薬を冷暗所（2~6℃）、密栓下で保管し、使用した。被験物質は、実験終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した（Appendix 1）。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。

被験物質の投与液は、メチルセルロース（和光純薬工業株式会社、100 cp、ロット番号 EWK3873）の 1%水溶液（局方精製水、共栄製薬株式会社）を媒体とし、所定の投与用量となる濃度の懸濁液に調製した。調製した投与液は、1 日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所（2~6℃）遮光下で密栓して保管した。冷所遮光下で 7 日間、その後室温遮光下で 1 日保管した投与液中の被験物質は、安定であることが確認された（Appendix 2）ので、調製後 8 日以内に使用した。初回に調製された投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した（Appendix 3）。

2. 動物および飼育条件

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

投与開始時の平均体重（体重範囲）は、雄 386（360~419）g、雌 239（214~264）g であった。ラットは、温度 22±3℃、湿度 55±10%、換気回数 10 回以上/時（オールフレッシュエアー方式）、照明 12 時間/日（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）に設

定したバリアーシステム動物室（第 2 室）で、個体別にステンレス製金網ケージ〔260W×380D×180 H(mm)〕に收容し、これをステンレス製 5 段のラックに配置して飼育した。ただし、交尾の成立した雌は、妊娠 0 日に巣作り材料（ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社）を入れたポリカーボネート製ケージ〔265W×426D×200H(mm)〕に收容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料（固型飼料ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社、ロット番号 20100652、20100861、20100957）および飲料水（孔径 1 μ m のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水）は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶（ポリカーボネートケージの場合）により、自由に摂取させた。

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

飼育期間中、動物室の温度は 20.1～24.6℃、湿度は 47～60%の範囲で推移 (Appendix 4) した。また、飼料および巣作り材料の汚染物質の分析結果 (Appendices 5、6) はいずれも、「米国環境保護庁有害物質規制法の飼料および媒体の汚染物質限度(1979)」等を参考にして当研究所が設定した許容範囲内にあり、飲料水は水道法に基づく水質基準に適合する (Appendix 7) ことが確認された。したがって、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

投与量設定試験として、10 週齢のラットを 1 群雌雄各 4 匹用い、50、100、200 および 400 mg/kg/day で 14 日間反復経口投与した結果、100 mg/kg 以上の群で雌雄に体重増加抑制、200 mg/kg 以上の群の雄および 400 mg/kg 群の雌に投与初期の摂餌量の減少が、また、400 mg/kg 群で雌雄に痙攣、自発運動低下、腹臥位、鼻周囲汚染、下腹部の尿による汚れなどの症状が認められ、雄で 1 匹、雌で 2 匹の死亡が認められた。剖検では、100 mg/kg 以上の群で雌雄に胸腺萎縮、400 mg/kg 群で雌雄に胃の拡張および主に雌に脾臓萎縮が認められた。器官重量では、絶対および相対重量に共通した変化として、50 mg/kg 以上の群の雄および 100 mg/kg 以上の群の雌に肝臓重量の高値、200 mg/kg 以上の群の雌雄に胸腺重量および雌に脾臓重量の低値が認められた。

以上のことから、本試験における投与量については、確実に毒性影響が発現すると予測される 100 mg/kg/day を高用量、毒性影響が発現しないと予測される 6 mg/kg/day を低用量とし、これらの用量の間に 25 mg/kg/day の計 3 用量を設定した。

試験群の構成は、①媒体投与群（以下、対照群）、②被験物質の 6 mg/kg/day 投与群（6 mg/kg 群）、③同 25 mg/kg/day 投与群（25 mg/kg 群）、④同 100 mg/kg/day 投与群（100 mg/kg 群）の 4 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には、媒体として用いたメチルセルロースの 1% 水溶液を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始 14 日前から、雄は 42 日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育 4 日まで、最短 42 日～最長 56 日間、1 日 1 回、午前中（8：48～12：00）に投与した。なお、全児死亡が認められた母動物の 4 匹中 3 匹については、哺育 3 日までの投与とした。

4. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

親動物について、次の項目を観察あるいは検査した。

(1) 一般状態

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

(2) 体重および摂餌量

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

(3) 雌の性周期検査

雌について、検疫・馴化期間に引き続き、投与開始日から交尾が確認されるまで、

Giemsa 染色による膣垢塗抹標本を作製し、鏡検により性周期段階の判定を行った。また、投与開始日から交配開始日までの性周期段階の判定から性周期を算出した。1 性周期は、発情期（Ⅲ期）像が認められた日から次の発情期像が認められた前日までとし、発情期像が連続した場合は、最初の発情期像が認められた日から起算した。

(4) 交配および分娩状態観察

交配前 2 週間の投与を終了（投与 15 日の午後）した雌雄を同一群内で 1 対 1 の組み合わせを作り、2 週間を限度として交尾が確認されるまで連続同居させた。交配期間中は毎朝一定時刻（9：30 頃）に交尾の確認を行い、交尾率（%） $[(交尾動物数 / 同居動物数) \times 100]$ を算出した。交尾は、膣栓形成あるいは膣垢中の精子の有無により確認し、確認された日を妊娠 0 日とした。分娩完了の確認は、午前 10 時までの時点において、母動物が営巣し、授乳を開始した状態を確認すること、又は母動物の膣周囲の状態を観察し、腹部を触診することによって行った。分娩の完了が確認された日を哺育 0 日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について、受胎率（%） $[(受胎雌数 / 交尾成立雌数) \times 100]$ 、妊娠期間（妊娠 0 日から分娩の完了が確認された日までの日数）および出産率（%） $[(生児出産雌数 / 妊娠雌数) \times 100]$ を算出した。

(5) 剖検および器官重量

雄の計画屠殺動物は投与 42 日の翌日、雌は哺育 5 日に、それぞれエーテル麻酔下で放血屠殺し、体表、開口部粘膜および内部諸器官を肉眼的に観察した。また、生存動物の雌雄の全例について、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓（剖検時に 100 mg/kg 群で腎臓の大型化を呈する個体が認められたため、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後測定した）および雄ではさらに精巣、精巣上体、前立腺、精嚢（凝固腺含む）を秤量（絶対重量）し、屠殺日の体重に基づいて対体重比（相対重量）を算出した。なお、対器官は左右を一括して秤量した。雌については、卵巣の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率（%） $[(着床数 / 黄体数) \times 100]$ を算出した。

(6) 病理組織学検査

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

病理組織学検査は、対照群および 100 mg/kg 群の雌雄全例の肝臓、腎臓、胸腺、脾

臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣および子宮について実施した。精巣については、精子形成サイクル検査（ステージⅡ・Ⅲ、Ⅴ、ⅦおよびⅩⅡ）も行った。その結果、被験物質の投与による影響が雌雄の肝臓および雄の腎臓に認められたため、その他の群においては雌雄の肝臓および雄の腎臓について検査を行った。妊娠不成立の雌雄については、下垂体、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣および子宮を検査した。また、剖検時に認められた乳腺の発育不良例についても検査した。検査は、常法に従ってパラフィン切片を作製し、H-E 染色を施して鏡検した。また、沈着物を同定するため、対照群と 100 mg/kg 群について、雄の各 2 例の腎臓に $\alpha_2\mu$ -グロブリン免疫組織化学染色および PAS 染色を施した。精子形成サイクル検査については PAS 染色を行った。

2) 新生児に関する項目

(1) 産児数、性比および外表観察

分娩完了の確認後速やかに各腹の産児数（生産児と死亡児の合計）、性別（肛門と生殖突起間距離の長短により判定）および口腔内を含む外表の異常を調べ、分娩率（%） $[(\text{総出産児数}/\text{着床数}) \times 100]$ を求めた。また、哺育 0 日の出産児の性比（雄出産児数/雌出産児数）を算出した。

(2) 一般状態・生児数

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

(3) 体重

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

(4) 病理学検査

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

5. 統計解析

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との有意差（危険率 5%以下）を、次

の方法で検定した。なお、出産児に関するデータは、1腹の平均を1標本とした。

(1) パラメトリックデータ

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

(2) ノンパラメトリックデータ

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

(3) カテゴリカルデータ

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

結 果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態および死亡 (Tables 1~4、Appendices 8~11)

100 mg/kg 群で、投与 3 日以降に口周囲を軽度濡らす程度の流涎が、雌雄ともに 12 匹中 11 匹に認められた。流涎は、ほとんどが投与直後に一過性に認められたが、少数例で投与直前の保定時にも認められた。

同群の雄で軽度な下腹部の尿による汚れおよび口鼻周囲の汚れが各 1 匹に認められた。これらの変化は、投与 10 日以内にみられ、その後は回復した。

6 および 25 mg/kg 群では、一般状態の変化は認められなかった。また、いずれの投与群においても死亡は認められなかった。

2) 体重 (Figures 1, 2、Tables 5, 6、Appendices 12, 13)

100 mg/kg 群で雄に投与 7 日以降、体重増加の抑制傾向がみられ、投与 7 日、14 日および 28 日の体重並びに投与期間中の体重増加量に有意な低値が認められた。同群の雌では、妊娠 14 日以降、哺育 4 日までの各測定時点で有意な低値並びに妊娠期間中の体重増加量の有意な低値および哺育期間中の体重増加量の低値傾向が認められた。

6 および 25 mg/kg 群では、体重および体重増加量に有意な変化は認められなかった。

3) 摂餌量 (Figures 3, 4、Tables 7, 8、Appendices 14, 15)

25 mg/kg 群の雄で、投与 21 日の摂餌量に有意な高値が認められた。100 mg/kg 群では、雄で投与 1 日に有意な低値および投与 14 日に有意な高値が、雌では投与 1 日、哺育 0 日および 3 日に有意な低値が認められた。

6 mg/kg 群では、有意な変化は認められなかった。

4) 剖検 (Tables 9, 10、Appendices 16, 17)

対照群で、雄に脾臓の大型化および精巢の小型化(両側性)が各 1 匹認められた。6 および 100 mg/kg 群で雌に乳腺発育不良が各 1 匹、100 mg/kg 群では雄の 3 匹に肝臓の大型化、雄の 2 匹に腎臓の大型化(両側性、内 1 匹は肝臓の大型化を伴う)が認められた。

5) 器官重量 (Tables 11, 12, Appendices 18~21)

6 mg/kg 群で雌に腎臓絶対重量の有意な低値が認められたが、相対重量に変化は認められなかった。25 mg/kg 群では、雄で肝臓の絶対および相対重量の有意な高値、雌で胸腺の絶対および相対重量の有意な低値並びに肝臓相対重量の有意な高値が認められた。100 mg/kg 群では、雄で肝臓および腎臓の絶対および相対重量の有意な高値、脾臓および精巣上体の絶対および相対重量の有意な低値、雌で胸腺の絶対および相対重量の有意な低値、肝臓および腎臓の相対重量の有意な高値が認められた。

6) 病理組織学検査 (Tables 13, 14, Appendices 16, 17, Photos 1~6)

肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 100 mg/kg 群で雌雄の各 12 匹中全例に認められた。雄の腎臓で近位尿細管上皮硝子滴が対照群、6、25 および 100 mg/kg 群で、それぞれ 9、9、12 および 12 匹にみられ、変化の程度は用量相関的に強くなる傾向が認められた。対照群および 100 mg/kg 群の各 2 例の腎臓について、 α_{2u} -グロブリン免疫組織化学染色および PAS 染色を行ったところ、PAS 反応陰性、 α_{2u} -グロブリン免疫染色陽性の結果が得られた。また、好塩基性尿細管が対照群、25 および 100 mg/kg 群で、それぞれ 3、3 および 7 匹にみられ、変化の程度は 100 mg/kg 群で強かった。

器官重量で低値が認められた 100 mg/kg 群の雄の脾臓および精巣上体並びに 25 mg/kg 以上の群の雌の胸腺、高値が認められた 100 mg/kg 群の雌の腎臓には、被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

精子形成サイクル検査では、100 mg/kg 群でステージXIIにおける精祖細胞数に有意な高値が認められたが、病理組織学検査では精巣に毒性変化は認められなかった。

以上の変化の他に、対照群のみ、あるいは対照群と被験物質投与群に、肝臓の微小肉芽腫（雌雄）、腎臓の近位尿細管上皮硝子滴（雌）、好塩基性尿細管（雌）、皮質リンパ球浸潤（雄）および遠位尿細管/集合管拡張（雌雄）、脾臓の髄外造血（雌雄）および褐色色素沈着（雌雄）、精巣の精細管萎縮（雄）、前立腺の間質リンパ球浸潤（雄）が認められたが、発現率や変化の程度が被験物質投与群で増強する傾向は認められなかった。また、被験物質投与群にのみ、肝臓の限局性胆管増殖（雌雄）および巣状壊死（雌雄）、胸腺の皮質萎縮（雌雄）、乳腺の低形成（雌）並びに剖検において対照群の雄でみられた精巣小型化例には精細管萎縮が、6 および 100 mg/kg 群の雌に認められた乳腺発育不

良例には乳腺の低形成が認められた。しかし、これらの変化はいずれも用量相関性のない少数例の発現で、ラットに背景病変として認められる変化³⁾でもあることから、被験物質の投与とは無関係な変化と判断された。

妊娠の成立しなかった 25 mg/kg 群の 1 ペア (No. 031 および No. 531) および 100 mg/kg 群の 1 ペア (No. 045 および No. 545) においては、生殖器系器官および下垂体に変化は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響

(1) 性周期検査 (Table 15、Appendices 22, 23)

被験物質投与各群とも、対照群と比べて平均性周期に有意な変化は認められなかった。なお、100 mg/kg 群で 2 匹 (No. 544、548) に投与 6 日および 7 日より発情休止期 (V 期) 像の持続が認められ、平均性周期の算出が出来なかった。この 2 匹は、投与 15 日まで V 期像の持続が認められた後、交配開始後の 2 日までに交尾が確認され、その後妊娠および分娩が確認されたことから、V 期像の持続期間については偽妊娠を起こしていたものと判断した。

また、対照群で交配開始後 2 日から 1 匹 (No. 504)、6 mg/kg 群で交配開始後 1 日から 1 匹 (No. 515) に発情休止期 (V 期) 像の持続が認められ、No. 504 では、交配開始後 12 日まで V 期像の持続が認められ、交配開始後 13 日に発情前期 (I 期) 像を示し、その翌日に交尾が確認され、その後妊娠および分娩が確認された。No. 515 においては、交配期間の最終日まで V 期像が持続し、交尾は確認できなかった。この 2 例の V 期像の持続期間についても偽妊娠を起こしていたものと判断した。

(2) 交尾率および受胎率 (Table 15、Appendix 24)

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

なお、6 mg/kg 群で 1 例の交尾不成立、25 および 100 mg/kg 群で各 1 例の妊娠不成立が認められた。交尾不成立の 1 例 (No. 015 と 515 のペア) は、交配期間中に膣栓や精子およびスメア像における交配適期は確認できなかったが、その雌 (No. 515) は、後日妊娠が確認され、正常な分娩および哺育が認められた。この雌については、記載可

能なデータは掲載したが、生殖発生に関するデータについては統計解析には含めなかった。

(3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 15、Appendix 24)

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

(4) 妊娠期間および出産率 (Table 15、Appendix 24)

被験物質投与各群とも、妊娠期間および出産率に有意な変化は認められなかった。

(5) 分娩および哺育状態 (Table 15、Appendix 24)

100 mg/kg 群で 12 匹中 4 匹の母動物において分娩後、全児死亡が哺育 0 日または 1 日に認められた。全児死亡が認められた母動物のうち 2 匹は哺育行動を示さなかった。他の多くの母動物においても、分娩および哺育行動には変化は認められなかったものの、哺育 0 日の時点で約 4 割の児動物の死亡が認められた。6 mg/kg 群で 1 匹の母動物 (No. 516) が分娩後、哺育 1 日まで哺育行動をほとんど示さず、児動物は哺育 4 日までに 13 匹中 10 匹が死亡した。対照群および 25 mg/kg 群では、分娩および哺育状態に変化を示す母動物は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 16、Appendix 25)

100 mg/kg 群で、哺育 0 日および 4 日の生児数および体重、出生率並びに哺育 4 日生存率に有意な低値が認められた。哺育 0 日の死亡児の多くは、剖検時に吸気肺であることが確認された。一腹当たりの総出産児数、分娩率および性比には有意な変化は認められなかった。また、生存児の一般状態に異常は認められなかった。

6 および 25 mg/kg 群では、総出産児数、生児数、体重、分娩率、出生率、生存率および性比に有意な変化は認められず、また、新生児の一般状態に異常は認められなかった。

(2) 病理学検査 (Table 17、18、Appendices 26, 27)

外表検査では、対照群および 6 mg/kg 群で矮小児が各 1 匹 (発現率 1.2% および 0.7%) 認められた以外は、いずれの投与群においても異常は認められなかった。内臓検査では、いずれの投与群においても異常は認められなかった。また、内臓変異として

左臍動脈遺残を呈する児動物が 6 mg/kg 群で 2 匹 (1.3%) および 25 mg/kg 群で 2 匹 (1.2%)、腎盂拡張を呈する児動物が 100 mg/kg 群で 4 匹 (2.8%) 認められた。

考 察

1. 反復投与毒性について

被験物質の投与に起因する変化が、主に肝臓および腎臓に認められた。

肝臓に対する影響について、25 および 100 mg/kg 群で雄に絶対および相対重量、雌に相対重量の高値が認められ、病理組織学検査では、100 mg/kg 群の雌雄に小葉中心性の肝細胞肥大が観察された。投与量設定試験として行った 14 日間反復経口投与においても 50 mg/kg 以上の群で肝臓重量の増加が認められ、また、ラットへの 28 日間反復経口投与毒性試験においても 40 mg/kg 群の雄および 200 mg/kg 群の雌雄で肝臓重量の増加および小葉中心性肝細胞肥大、並びに 200 mg/kg 群の雌雄でこの肝臓の変化と関連する血液生化学的変化が報告されており²⁾、本試験においても同様に肝臓に対する毒性影響が確認された。

腎臓に対する影響について、25 mg/kg 以上の群で雄に近位尿細管上皮硝子滴の増加が認められた。この硝子滴は、 α_{2u} -グロブリン免疫染色陽性で、雄ラットに特有のいわゆる α_{2u} -グロブリン腎症であることが確認された。100 mg/kg 群の雄に変化の程度が強かった好塩基性尿細管の発現並びに腎臓の絶対および相対重量の高値は、この α_{2u} -グロブリン腎症と関連する変化と考えられる。28 日間反復経口投与毒性試験においても 8 mg/kg 以上の群で雄に近位尿細管上皮硝子滴がみられ、用量相関的な変化の増強が認められている²⁾。

このような腎臓に対する影響は、ヒトの健康に対する有害性の観点からは意義のない変化と判断された。

100 mg/kg 群で雄に認められた脾臓および精巣上体の絶対および相対重量の低値、25 mg/kg 以上の群で雌に認められた胸腺の絶対および相対重量の低値並びに 100 mg/kg 群で雌に認められた腎臓相対重量の高値については、いずれの臓器にも病理組織学変化は認められず、100 mg/kg 群の雌における変化は、剖検時の体重が有意に低いことに関連した変化と考えられる。28 日間反復経口投与毒性試験においても、200 mg/kg 群で病理組織学変化を伴わない雌の腎臓相対重量の増加、雄で脾臓絶対重量の減少が認められている²⁾。これらの変化は、いずれも毒性学的意義は低いものと考えられた。

100 mg/kg 群で雌雄に認められた体重増加抑制や摂餌量の変化は、28 日間反復経口投与毒性試験においても 200 mg/kg 群で認められており²⁾、被験物質投与による毒性

影響が確認された。

なお、25 mg/kg 群の雄で投与 21 日に認められた摂餌量の有意な高値は、前後の測定値に変化はなく、また、体重にも影響が認められないことから、偶発的変化と判断された。また、100 mg/kg 群で認められた流涎は、ほとんどが投与直前に一過性に認められたことから、投与液の刺激性によるものと推察され、被験物質の毒性と関連した変化ではないものと判断された。

2. 生殖発生毒性について

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

なお、25 および 100 mg/kg 群で認められた妊娠不成立の各 1 例については、雌雄の生殖器官に病理組織学変化は認められず、また、少数例の発現であることから、投与とは無関係な偶発的なものと判断された。

6 mg/kg 群で分娩後、哺育行動をあまり示さなかった母動物 (No. 516) は、妊娠期間中に体重増加抑制が認められ、哺育期間中の体重増加はほとんどなく、乳腺の低形成が認められた。しかし、1 例のみの変化であり、25 mg/kg 群で同様の変化は認められていないことから、偶発的なものと判断された。

児の発生に対しては、100 mg/kg 群で哺育 0 日および 4 日の生児数および体重、出生率並びに哺育 4 日生存率に有意な低値が認められ、新生児の多くは生後数時間以内で死亡し、明らかな毒性影響が認められた。

これらの変化は、母動物の妊娠期間および哺育期間中の体重増加抑制並びに哺育期間中の摂餌量の低下による栄養状態の悪化に伴う非特異的な毒性影響を示すものと考えられる。

なお、被験物質投与群で外表異常および内臓変異を呈する児動物が少数例認められたが、いずれも有意差のある発現率ではなく、用量相関的な増加傾向もないことから、自然発生的範疇⁴⁾の変化と判断された。

以上の結果から、1, 3-ジシアノベンゼンの親動物への反復投与において、25 mg/kg 群で雌雄に肝臓重量の高値、100 mg/kg 群で雌雄に小葉中心性肝細胞肥大が認められた

ことから、反復投与毒性における無影響量 (NOEL) は雌雄とも 6 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL は、親動物に対しては、毒性影響が認められなかったことから、100 mg/kg/day、児動物に対しては、100 mg/kg 群で生児数、体重、出生率および生存率に低値が認められたことから、25 mg/kg/day と推定した。

文 献

- 1) “12394 の化学商品”, 化学工業日報社, 1994.
- 2) ██████████ 1, 3-ジシアノベンゼンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, 化学物質毒性試験報告, 4, 511-520, 1996.
- 3) 日本毒性病理学会編, “毒性病理組織学”, 日本毒性病理学会, 2000.
- 4) Morita, H., et al, (1987). Spontaneous malformations in laboratory animals. Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice, *Cong. Anom.*, 27, 147-206.

1, 3-ジシアノベンゼンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

(試験番号：10-034)

最終報告書 添付資料A

(図・群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

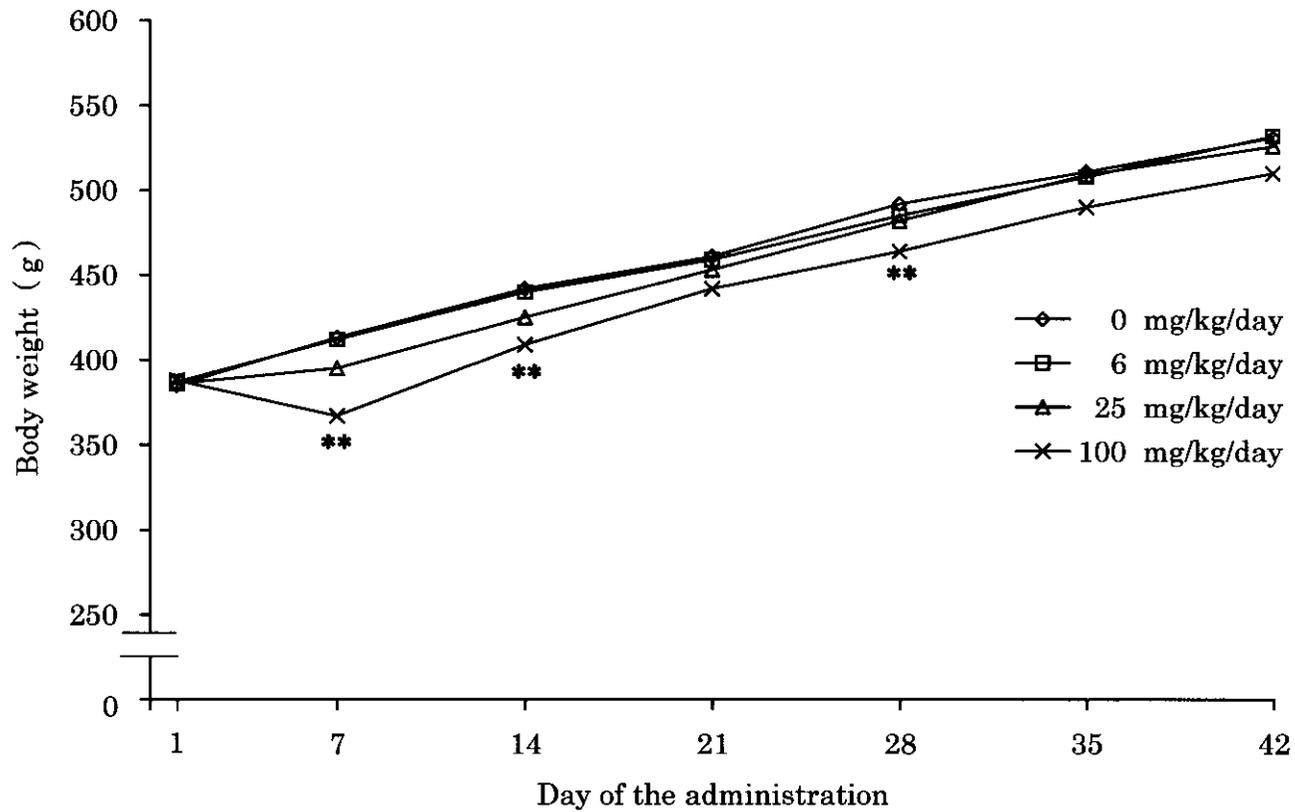


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

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

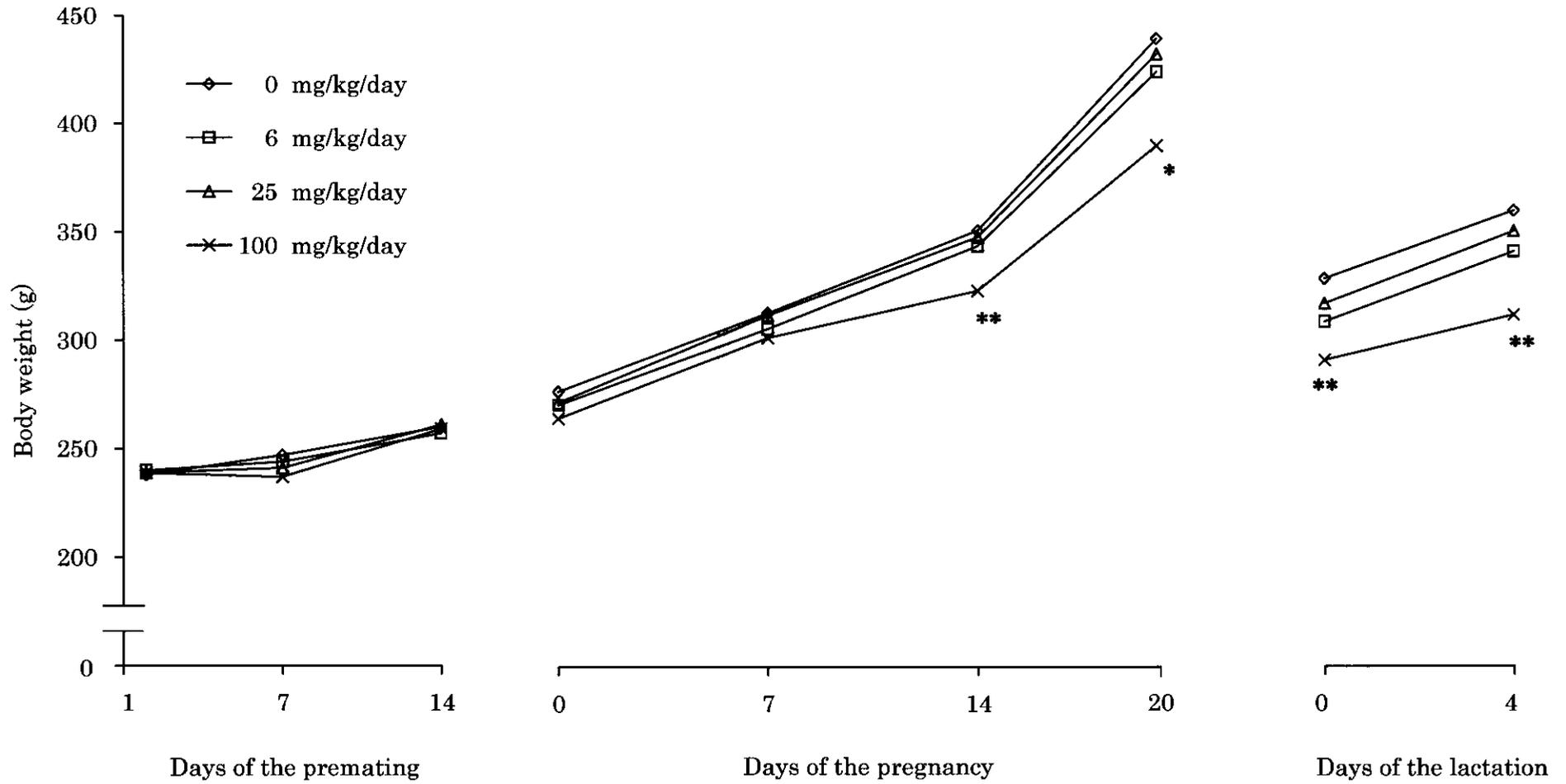


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

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

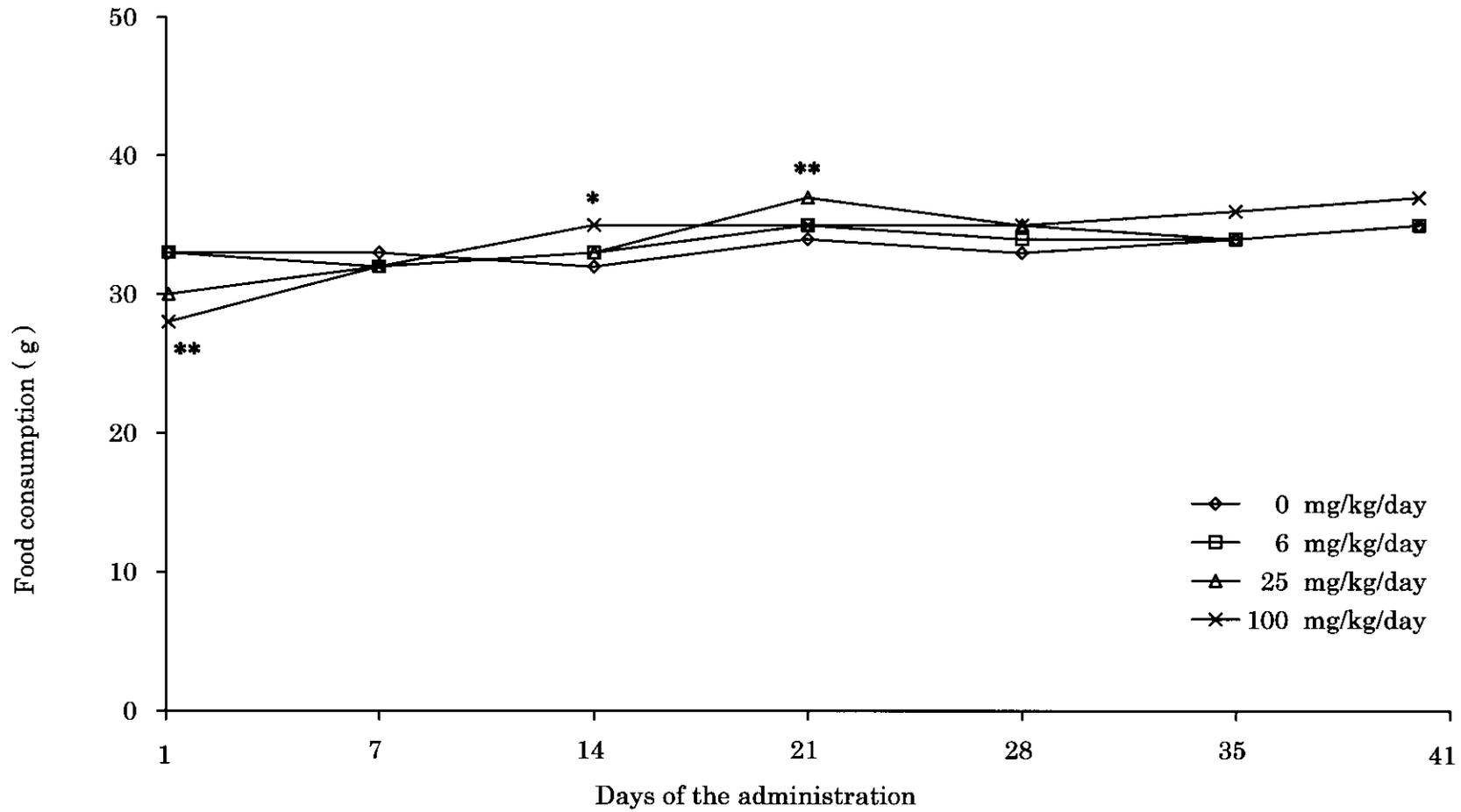


Fig. 3 Food consumption changes of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

* : Significantly different from control at 5% level of probability.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

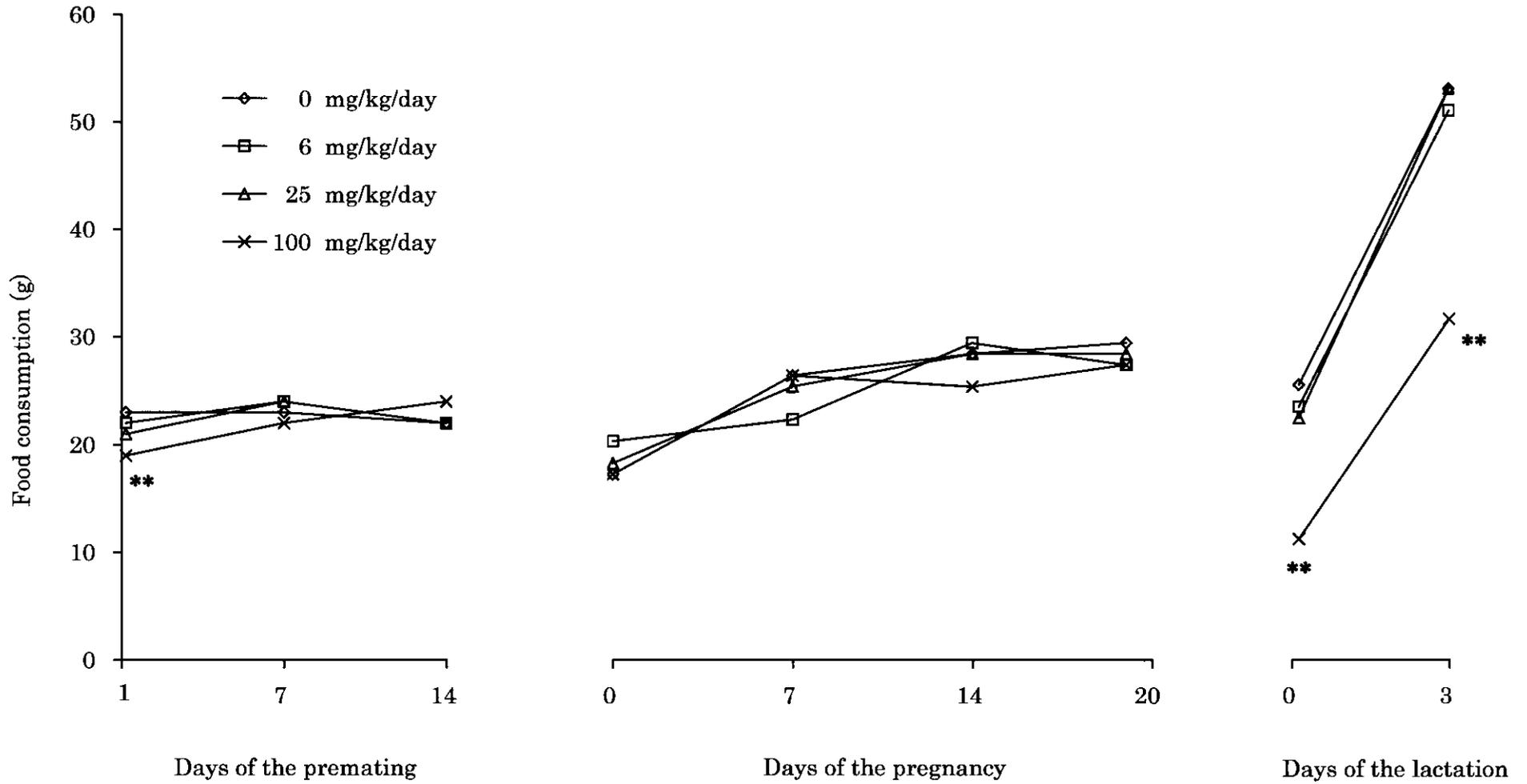


Fig. 4 Food consumption changes of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

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

Table 1 Mortality rate of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	6	25	100
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of animals that died	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0

Table 2 Mortality rate of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	6	25	100
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of animals that died	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0

Table 3 Clinical signs of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

General conditions		Dose (mg/kg/day)	0	6	25	100
(Clinical signs)		Fate	TK	TK	TK	TK
	Grade	No. of animals	12	12	12	12
Salivation	—		12	12	12	1
	+		0	0	0	11 **
Smudge around mouth nose	—		12	12	12	11
	+		0	0	0	1
Soiled perineal region	—		12	12	12	11
	+		0	0	0	1

TK : Terminal killing.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

- : Negative. + : Slight.

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

Table 4 Clinical signs of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

General conditions	Dose (mg/kg/day)			0		6		25		100		
		Fate		TK	TK	TK	NP	TK	NP	KL		
(Clinical signs)	Grade	No. of animals		12	12	11	1	7	1	4		
Salivation	-			12	12	11	1	1	0	0		
	+			0	0	0	0	6	1	4		

TK : Terminal killing on day 5 after perturbation.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

KL : Killed because all pups died after delivery.

- : Negative. + : Slight.

Table 5 Body weights of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Days of administration period							Gain 1~42
	1	7	14	21	28	35	42	
0	385	413	442	461	492	511	531	146
	± 11 (12)	± 16 (12)	± 17 (12)	± 21 (12)	± 21 (12)	± 19 (12)	± 23 (12)	± 16 (12)
6	387	412	440	459	485	508	532	145
	± 12 (12)	± 19 (12)	± 19 (12)	± 20 (12)	± 21 (12)	± 24 (12)	± 26 (12)	± 18 (12)
25	386	395	425	453	482	509	526	140
	± 14 (12)	± 14 (12)	± 18 (12)	± 20 (12)	± 21 (12)	± 23 (12)	± 23 (12)	± 15 (12)
100	388	367 **	409 **	442	464 **	490	510	122 **
	± 13 (12)	± 25 (12)	± 18 (12)	± 18 (12)	± 22 (12)	± 26 (12)	± 31 (12)	± 25 (12)

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n) : No. of animals.

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

Table 6 Body weights of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Days of the pre-mating			Gain 1~14	Days of the pregnancy				Gain 0~20	Days of the lactation		Gain 0~4
	1	7	14		0	7	14	20		0	4	
0	238 ± 13 (12)	247 ± 15 (12)	260 ± 14 (12)	22 ± 5 (12)	273 ± 15 (12)	308 ± 14 (12)	345 ± 15 (12)	431 ± 31 (12)	158 ± 34 (12)	321 ± 20 (12)	351 ± 15 (12)	30 ± 12 (12)
6	240 ± 12 (12)	244 ± 9 (12)	257 ± 11 (12)	18 ± 10 (12)	267 ± 18 (11)	301 ± 31 (11)	338 ± 37 (11)	416 ± 55 (11)	149 ± 41 (11)	302 ± 40 (12)	333 ± 44 (12)	30 ± 20 (12)
25	239 ± 13 (12)	241 ± 16 (12)	261 ± 17 (12)	22 ± 8 (12)	268 ± 14 (11)	307 ± 18 (11)	342 ± 23 (11)	424 ± 32 (11)	155 ± 19 (11)	310 ± 23 (11)	342 ± 26 (11)	32 ± 12 (11)
100	239 ± 11 (12)	237 ± 11 (12)	259 ± 18 (12)	21 ± 10 (12)	261 ± 19 (11)	297 ± 19 (11)	318 ** ± 17 (11)	383 * ± 26 (11)	122 * ± 21 (11)	285 ** ± 18 (11)	305 ** ± 15 (7)	17 ± 8 (7)

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n) : No. of animals.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

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

Table 7 Food consumption of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Days of the administration							
	1	7	14	21	28	35	41	
0	33	33	32	34	33	34	35	
	± 4 (12)	± 4 (12)	± 2 (12)	± 1 (11) ^a	± 2 (11) ^a	± 2 (12)	± 2 (12)	
6	33	32	33	35	34	34	35	
	± 3 (12)	± 3 (12)	± 3 (12)	± 3 (11) ^a	± 2 (11) ^a	± 2 (12)	± 3 (12)	
25	30	32	33	37 ^{**}	35	34	35	
	± 4 (12)	± 2 (12)	± 2 (12)	± 1 (12)	± 2 (12)	± 2 (12)	± 2 (12)	
100	28 ^{**}	32	35 [*]	35	35	36	37	
	± 3 (12)	± 6 (12)	± 3 (12)	± 3 (12)	± 4 (12)	± 3 (12)	± 3 (12)	

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n) : No. of animals.

a : One animal could not measured because of mating.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

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

Table 8 Food consumption of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	(g/rat/day)										
	Days of the pre mating			Days of the pregnancy				Days of the lactation			
	1	7	14	0	7	14	20	0	3		
0	23 ± 3 (12)	23 ± 2 (12)	22 ± 3 (12)	17 ± 3 (12)	26 ± 4 (12)	28 ± 3 (12)	29 ± 3 (12)	25 ± 7 (12)	52 ± 7 (12)		
6	22 ± 3 (12)	24 ± 3 (12)	22 ± 3 (12)	20 ± 3 (11)	22 ± 7 (11)	29 ± 4 (11)	27 ± 7 (11)	23 ± 12 (12)	50 ± 15 (12)		
25	21 ± 3 (12)	24 ± 2 (12)	22 ± 4 (12)	18 ± 3 (11)	25 ± 4 (11)	28 ± 2 (11)	28 ± 4 (11)	22 ± 12 (11)	52 ± 6 (11)		
100	19 ** ± 2 (12)	22 ± 3 (12)	24 ± 3 (12)	17 ± 4 (11)	26 ± 4 (11)	25 ± 3 (11)	27 ± 4 (11)	11 ** ± 6 (10)	31 ** ± 8 (7)		

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n) : No. of animals.

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

Table 9 Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0		25		100	
				Fate	KD	KD	FP	KD	FP
			No.of animals	12	12	11	1	11	1
Liver	: Enlargement	+		0	0	0	0	3	0
Kidney	: Enlargement, both side	+		0	0	0	0	1	1
Spleen	: Enlargement	+		1	0	0	0	0	0
Testis	: Small, both side	+		1	0	0	0	0	0

KD : Killed by design after administration period.

FP : Failed to cause pregnancy.

+ : Slight.

Table 10 Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0		6		25		100		
				Fate	No.of animals	KD	KD	KD	NP	KD	NP	KL
					12		12	11	1	7	1	4
Mammary gland	: Immatureness	+			0		1	0	0	1	0	0

KD : Killed by design after administration period.

NP : Non pregnant.

KL : Killed because all pups died after delivery.

+ : Slight.

Table 11 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	B.W. (g)	Thymus (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Prostate (g)	Seminal vesicle (g)	Testis (g)	Epididy- mis (g)	Kidney ^a (g)
Absolute	0	12	491 ±22	0.36 ±0.08	12.16 ±0.87	0.89 ±0.17	0.79 ±0.23	2.44 ±0.27	3.32 ±0.37	1.42 ±0.16	3.00 ±0.34
	6	12	491 ±26	0.38 ±0.09	12.43 ±0.90	0.87 ±0.11	0.81 ±0.18	2.56 ±0.30	3.29 ±0.30	1.43 ±0.11	3.09 ±0.41
	25	12	491 ±20	0.34 ±0.09	13.45 * ±1.13	0.85 ±0.11	0.74 ±0.16	2.34 ±0.35	3.39 ±0.25	1.37 ±0.13	3.28 ±0.29
	100	12	468 ±26	0.29 ±0.05	15.76 ** ±1.78	0.69 ** ±0.11	0.69 ±0.17	2.49 ±0.28	3.29 ±0.22	1.20 ** ±0.14	3.55 ** ±0.33
Relative @	0	12	491 ±22	0.07 ±0.02	2.48 ±0.15	0.18 ±0.03	0.16 ±0.05	0.50 ±0.05	0.68 ±0.07	0.29 ±0.03	0.61 ±0.07
	6	12	491 ±26	0.08 ±0.02	2.53 ±0.16	0.18 ±0.02	0.17 ±0.04	0.52 ±0.05	0.67 ±0.06	0.29 ±0.02	0.63 ±0.08
	25	12	491 ±20	0.07 ±0.02	2.74 ** ±0.18	0.18 ±0.03	0.15 ±0.03	0.48 ±0.07	0.69 ±0.06	0.28 ±0.03	0.67 ±0.05
	100	12	468 ±26	0.06 ±0.01	3.37 ** ±0.28	0.15 ** ±0.02	0.15 ±0.04	0.53 ±0.06	0.71 ±0.06	0.26 * ±0.04	0.76 ** ±0.06

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100 g body weight.

a : Examined after fixed in formaline.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

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

Table 12 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	B.W. (g)	Thymus (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Kidney ^a (g)
Absolute	0	12	323 ±14	0.27 ±0.04	11.04 ±0.94	0.69 ±0.11	1.92 ±0.22
	6	12	308 ±40	0.25 ±0.08	10.58 ±2.06	0.68 ±0.12	1.72 * ±0.15
	25	11	309 ±23	0.20 * ±0.04	11.58 ±1.14	0.74 ±0.16	1.85 ±0.12
	100	7	290 ** ±17	0.17 ** ±0.05	11.80 ±0.78	0.57 ±0.09	1.98 ±0.23
Relative @	0	12	323 ±14	0.08 ±0.01	3.42 ±0.28	0.21 ±0.03	0.59 ±0.06
	6	12	308 ±40	0.08 ±0.02	3.41 ±0.38	0.22 ±0.03	0.57 ±0.05
	25	11	309 ±23	0.07 * ±0.01	3.75 * ±0.25	0.24 ±0.04	0.60 ±0.05
	100	7	290 ** ±17	0.06 ** ±0.02	4.08 ** ±0.21	0.20 ±0.03	0.68 ** ±0.05

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100 g body weight.

a : Examined after fixed in formaline.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

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

Table 13-1 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0			25			100		
				Fate	KD	KD	KD	FP	Total	KD	FP	Total
				No.of animals	12	12	11	1	12	11	1	12
Liver	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+		0	0	0	0	0	10	1	11	
		++		0	0	0	0	0	1	0	1 **	
		Proliferation, bile duct, focal	+		0	1	0	0	0	0	0	
		Necrosis, focal	+		0	1	1	0	1	0	0	
		Microgranuloma	+		9	6	4	0	4	6	0	6
Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	+		9	8	4	0	4	0	0	0	
		++		0	1	5	1	6	0	0	0	
		+++		0	0	2	0	2 **	11	1	12 **	
		Basophilic tubule	+		3	0	3	0	3	2	0	2
			++		0	0	0	0	0	5	0	5
		Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	+		1	0	0	0	0	1	0	1
		Dilatation, distal/collecting tubules	+		5	1	1	0	1	7	1	8
Thymus	: Atrophy, cortical	+		0	#	#	#	#	1	0	1	

KD : Killed by design after administration period.

FP : Failed to cause pregnancy.

+ : Slight; ++ : Moderate; +++ : Severe.

: Not examined.

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

Table 13-2 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0		25			100			
				Fate	KD	KD	KD	FP	Total	KD	FP	Total
				No.of animals	12	12	11	1	12	11	1	12
Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary	+		11	#	#	#	#	11	1	12	
		+++		1	#	#	#	#	0	0	0	
	: Deposit, pigment, brown	+		8	#	#	#	#	10	1	11	
		+++		1	#	#	#	#	0	0	0	
Testis	: Atrophy, seminiferous tubule	+		0	#	#	0/1	0/1	1	0	1	
		++		1	#	#	0/1	0/1	0	0	0	
Prostate	: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	+		3	#	#	0/1	0/1	2	0	2	

KD : Killed by design after administration period; FP : Failed to cause pregnancy.

+ : Slight; ++ : Moderate; +++ : Severe.

: Not examined.

No abnormalities were detected in the pituitary, epididymis and seminal vesicle from animals of control, FP and 100 mg/kg group.

Table 13-3 The number of cells in seminiferous epithelia assessed by the individual examination in male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	No. of animals		Stage II-III			Stage V			Stage VII			Stage X II	
			G	P	T	G	P	T	G	R/P	T	G	Z/P
0	11	Mean	0.44	1.82	5.65	0.61	1.88	6.00	0.06	3.01	6.13	0.06	4.14
		S.D.	0.06	0.16	0.53	0.04	0.15	0.28	0.01	0.18	0.30	0.01	0.18
100	12	Mean	0.46	1.76	5.84	0.64	1.84	5.85	0.05	2.95	5.86	0.07 *	4.30
		S.D.	0.08	0.19	0.56	0.05	0.14	0.41	0.005	0.19	0.46	0.01	0.41

G : spermatogonia.

P : pachytene spermatocyte.

R : preleptotene spermatocyte.

Z : zygotene spermatocyte.

T : round spermatid.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 14 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0		25			100				
				Fate	KD	KD	KD	NP	Total	KD	NP	KL	Total
				No.of animals	12	12	11	1	12	7	1	4	12
Liver	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+		0	0	0	0	0	7	1	4	12	**
	Proliferation, bile duct, focal	+		0	0	1	0	1	0	0	0	0	
	Necrosis, focal	+		0	3	1	0	1	0	0	0	0	
	Microgranuloma	+		8	0	2	0	2	3	1	2	6	
Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	+		1	#	#	#	#	0	0	0	0	
	Basophilic tubule	+		1	#	#	#	#	1	0	0	1	
	Dilatation, distal/collecting tubules	+		7	#	#	#	#	2	0	2	4	
Thymus	: Atrophy, cortical	+		0	#	#	#	#	0	0	1	1	
Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary	+		12	#	#	#	#	7	1	4	12	
	Deposit, pigment, brown	+		10	#	#	#	#	6	0	2	8	
		++		0	#	#	#	#	0	1	2	3	
Mammary gland	: Hypoplasia	+		0	1/1 ^a	#	#	#	1/1 ^a	#	1/4	2/5	

KD : Killed by design after administration period; NP : Non-pregnant; KL : Killed because all pups died after delivery.

+ : Slight; ++ : Moderate.

: Not examined; a : Examined the animal with a macroscopic abnormality.

No abnormalities were detected in the pituitary, ovary and uterus from animals of control, NP and 100 mg/kg group.

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

Table 15 Reproduction results of rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0			6			25			100						
Estrous cycle (days, Mean ± S.D.)	4.1	±	0.3	(0/12) ^a	4.1	±	0.2	(0/12) ^a	4.0	±	0.0	(0/12) ^a	4.2	±	0.3	(2/12) ^a
No. of pairs mated	12				12				12				12			
No. of pairs with successful copulation	12				11				12				12			
Copulation index (%)	100				91.7				100				100			
Pairing days until copulation (days, Mean ± S.D.)	3.7	±	3.4		2.7	±	1.3		2.7	±	1.4		2.4	±	1.2	
No. of pregnant females	12				11				11				11			
Fertility index (%)	100				100				91.7				91.7			
No. of corpora lutea (Mean ± S.D.)	16.3	±	2.3		15.5	±	2.0		17.5	±	1.7		16.0	±	2.4	
No. of implantation sites (Mean ± S.D.)	15.3	±	3.3		14.4	±	3.7		16.3	±	1.2		14.4	±	4.4	
Implantation index (% , Mean ± S.D.)	93.2	±	11.9		91.7	±	18.9		93.7	±	7.4		88.4	±	24.5	
No. of pregnant females with parturition	12				11				11				11			
Gestation length (days, Mean ± S.D.)	22.4	±	0.5		22.5	±	0.5		22.6	±	0.5		22.8	±	0.4	
No. of pregnant females with live pups	12				11				11				11			
Gestation index (%)	100				100				100				100			
No. of pregnant females with live pups on day 4	12				11				11				7			

Estrous cycle : Mean days from metaestrus I(III) to next III.

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

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

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

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

Implantation index = (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) × 100.

Table 16 Litter results of rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0		6		25		100	
No. of pregnant females with live pups on day 4	12		11		11		7	
No. of pups born	14.7	± 3.4	14.0	± 3.6	15.0	± 1.8	12.5	± 3.6
Delivery index (%)	95.7	± 5.6	97.8	± 5.5	92.3	± 10.1	88.6	± 12.6
No. of pups alive on day 0 of lactation								
Total	14.5	± 3.4	13.9	± 3.6	14.5	± 2.2	7.6	± 4.8 **
Male	6.8	± 3.4	7.8	± 2.7	6.6	± 2.0	3.5	± 2.7 *
Female	7.8	± 2.1	6.1	± 2.5	7.9	± 1.5	4.1	± 2.8 **
Live birth index (%)	99.0	± 2.4	99.3	± 2.3	96.7	± 5.4	59.5	± 29.1 **
Sex ratio(Male/Male + Female)	0.89		1.30		0.88		0.96	
No. of pups alive on day 4 of lactation								
Total	14.1	± 3.1	13.0	± 4.9	14.0	± 2.3	3.1	± 4.1 **
Male	6.6	± 3.2	7.4	± 3.2	6.5	± 1.9	1.5	± 1.7 **
Female	7.5	± 2.3	5.6	± 2.9	7.5	± 1.8	1.5	± 2.5 **
Viability index (%)	97.5	± 3.8	93.0	± 23.2	96.4	± 8.2	28.0	± 32.4 **
Body weight of live pups (g)								
on day 0								
Male	7.0	± 0.8	6.9	± 0.8	6.7	± 0.6	6.0	± 0.3 **
Female	6.8	± 0.7	6.5	± 1.0	6.4	± 0.5	5.7	± 0.8 **
on day 4								
Male	10.8	± 1.7	10.5	± 2.7	10.8	± 1.5	7.5	± 1.5 **
Female	11.1	± 1.6	10.2	± 2.9	10.6	± 1.4	7.8	± 1.2 **

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

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

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

Sex ratio = (Total number of male pups / Total number of male and female pups).

Each value is expressed as Mean±S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

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

Table 17 External findings of pups obtained from pregnant rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	6	25	100
No. of pups examined	176	154	165	137
No. of pups with external malformations [#]	1 (1.2 ± 4.1)	1 (0.7 ± 2.3)	0 (0)	0 (0)
Dwarf	1 (1.2 ± 4.1)	1 (0.7 ± 2.3)	0 (0)	0 (0)

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

Table 18 Visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	6	25	100
No. of pups examined	176	154	165	137
No. of pups with visceral malformations	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No. of pups with visceral variations	0 (0)	2 (1.3±2.8)	2 (1.2±2.6)	4 (2.8±6.3)
Persistent left umbilical artery	0 (0)	2 (1.3±2.8)	2 (1.2±2.6)	0 (0)
Dilatation of renal pelvis	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (2.8±6.3)

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

1, 3-ジシアノベンゼンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

(試験番号：10-034)

最終報告書 添付資料B

(個体別表等)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

Appendix 1 Test item characterization

被験物質の特性

名 称 : 1, 3-ジシアノベンゼン

英名 1, 3-Dicyanobenzene

別 名 : 1, 3-Benzenedicarbonitrile, 1, 3-Benzodinitrile,
3-Cyanobenzonitrile, Isophthalonitrile

CAS 番号: 626-17-5

ロット番号: XJ5VC

純 度 : 99.9%、XXXXXXXXXXからの
情報

入 手 先 : 東京化成工業株式会社（東京都中央区日本橋 4-10-2）から試薬を購入

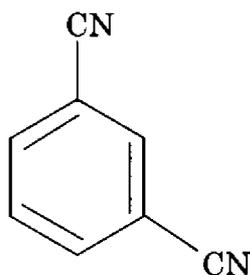
入手日・量 : 平成 22 年 6 月 9 日（1000 g）

物 性 等 :

化学名 1, 3-ジシアノベンゼン

分子式 $C_6H_4N_2$

構造式



分子量 128.13

性状（常温） 白色粉末

融点 162°C

蒸気密度 4.42

溶解性 熱水に微溶、熱アルコール、ベンゼン、クロロホルムに可溶

安 定 性 : 安定〔実験終了後、残余被験物質を分析（2010年11月27日：東京化成工業株式会社、マクロケルダール法）した結果、純度は 99.8%

であり、安定であったことを確認した。]

保管条件： 冷暗所（2～6℃）、密栓

Appendix 2 Stability of the test article in the dosing solutions

被験物質の投与形態での安定性

「1, 3-ジシアノベンゼンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験（試験番号：10-034）」を実施するに当たり、被験物質の投与形態での安定性を調べるため、媒体としてメチルセルロース（和光純薬工業株式会社、100 cp、ロット番号 EWK3873）の1%水溶液（局方精製水、共栄製薬株式会社）を用いて1, 3-ジシアノベンゼン（ロット番号：XJ5VC）の0.1%濃度および4%濃度の懸濁液を調製し、調製直後および調製後冷所（2～6℃）、遮光下で7日保存後、それぞれ室温・遮光下で1日保存したものについて上、中および下層よりサンプリングし、濃度を分析（HPLC法）した。得られた結果は、次表に示す。

調製濃度 (%)	分析時点	分析値 (%)				変動係数 (%)
		上層	中層	下層	平均値	
0.1	調製直後	0.10	0.10	0.10	0.10	0
	8日後	0.10	0.10	0.10	0.10	0
4	調製直後	4.0	4.1	4.1	4.1	1.4
	8日後	4.1	4.0	4.1	4.1	1.4

以上の結果から、メチルセルロースの1%水溶液に懸濁した1, 3-ジシアノベンゼンは、冷所（2～6℃）で7日保存後、室温・遮光下で1日保存した場合において、均一、かつ安定であることが確認された。

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

投与液中の被験物質濃度の確認

「1,3-ジシアノベンゼンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験（試験番号：10-034）」のための被験物質投与液について、所定の濃度で調製されていることを確認するため、初回に調製された1,3-ジシアノベンゼンのメチルセルロースの1%水溶液による懸濁液（6 mg/kg 群用：1.2 mg/mL、25 mg/kg 群用：5 mg/mL および 100 mg/kg 群用：20 mg/mL）について、それぞれ3反復分析（HPLC法）した。得られた結果は、次表に示す。

調製濃度 (mg/mL)	分析値 (mg/mL)			
	上層	中層	下層	平均値
1.2	1.24	1.27	1.24	1.25
5	4.6	4.6	4.4	4.5
20	20.3	20.5	20.3	20.4

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

Appendix 4-1 Environmental conditions of animal room

Result of temperature and relative humidity at animal room No. 2

Date	Temperature (°C)	Humidity (%)	Note
2010/9/2	22.4 - 24.2	48 - 50	Arrival of animals
2010/9/3	22.9 - 24.2	49 - 53	
2010/9/4	23.1 - 24.6	48 - 51	
2010/9/5	23.1 - 24.3	49 - 55	Start of the examination of estrous cycle
2010/9/6	23.0 - 24.3	50 - 52	
2010/9/7	22.9 - 24.4	49 - 52	
2010/9/8	23.1 - 23.3	51 - 52	
2010/9/9	22.0 - 23.3	53 - 55	
2010/9/10	22.5 - 23.8	50 - 55	
2010/9/11	22.8 - 24.1	50 - 54	
2010/9/12	23.2 - 24.2	50 - 53	
2010/9/13	23.3 - 24.4	50 - 53	
2010/9/14	23.4 - 24.2	49 - 53	Grouping
2010/9/15	22.9 - 23.6	51 - 53	Start of administration
2010/9/16	22.4 - 22.7	55	
2010/9/17	21.9 - 23.5	52 - 57	
2010/9/18	22.4 - 23.4	53 - 57	
2010/9/19	22.5 - 23.6	52 - 57	
2010/9/20	22.6 - 23.4	53 - 56	
2010/9/21	22.5 - 23.7	51 - 56	
2010/9/22	22.8 - 24.2	51 - 55	
2010/9/23	22.4 - 23.1	54 - 58	
2010/9/24	21.6 - 21.8	54 - 58	
2010/9/25	20.1 - 21.7	57 - 58	
2010/9/26	21.3 - 22.6	56 - 59	
2010/9/27	21.5 - 22.1	58 - 59	
2010/9/28	21.2 - 22.2	57 - 60	
2010/9/29	22.3 - 23.2	57	Start of mating
2010/9/30	22.2 - 22.4	54 - 58	
2010/10/1	22.2 - 22.4	55 - 57	
2010/10/2	22.0 - 23.0	54 - 59	
2010/10/3	22.0 - 22.9	54 - 59	
2010/10/4	22.2 - 23.0	55 - 57	
2010/10/5	22.3 - 23.1	54 - 57	
2010/10/6	22.0 - 23.0	54 - 57	

Appendix 4-2 Environmental conditions of animal room

Result of temperature and relative humidity at animal room No. 2

Date	Temperature (°C)	Humidity (%)	Note
2010/10/7	21.9 - 23.1	54 - 56	
2010/10/8	22.2 - 23.0	54 - 59	
2010/10/9	21.9 - 22.4	57 - 58	
2010/10/10	22.4 - 22.7	55 - 56	
2010/10/11	22.3 - 23.0	54 - 57	
2010/10/12	22.3 - 23.0	54 - 58	
2010/10/13	22.3 - 23.2	55 - 57	End of mating
2010/10/14	22.1 - 22.9	54 - 56	
2010/10/15	22.2 - 22.7	56 - 57	
2010/10/16	22.0 - 22.9	54 - 60	
2010/10/17	22.4 - 22.8	55 - 58	
2010/10/18	22.0 - 22.8	55 - 57	
2010/10/19	22.1 - 22.8	57 - 58	
2010/10/20	22.3 - 22.7	56 - 58	
2010/10/21	22.2 - 22.5	56 - 58	
2010/10/22	22.1 - 22.4	56 - 58	
2010/10/23	22.4 - 22.7	55 - 57	
2010/10/24	22.1 - 22.7	57 - 58	
2010/10/25	22.5 - 23.0	56 - 58	
2010/10/26	22.1 - 23.2	57 - 59	Necropsy of females
2010/10/27	21.7 - 21.9	51 - 56	Necropsy of males
2010/10/28	22.0 - 22.4	54 - 55	
2010/10/29	22.0 - 24.6	47 - 55	
2010/10/30	22.2 - 22.5	52 - 55	
2010/10/31	21.9 - 22.5	52 - 54	
2010/11/1	22.3 - 22.5	52 - 53	
2010/11/2	22.0 - 22.4	52 - 53	
2010/11/3	21.7 - 22.1	52 - 54	
2010/11/4	22.2 - 22.4	52	
2010/11/5	21.8 - 22.3	52 - 54	
2010/11/6	21.7 - 22.2	52 - 54	
2010/11/7	22.0 - 22.4	52 - 58	
2010/11/8	21.8 - 22.4	51 - 54	
2010/11/9	22.2 - 22.6	52 - 53	Necropsy of female
2010/11/10	21.9 - 22.1	52 - 54	Necropsy of female

Appendix 5-1 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences
IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Ninonbashi hakozaiki-cho Chuo-ku Tokyo 103-0016 JAPAN
TEL 03-56601981 FAX 03-56631985

Date : June 28, 2010

CERTIFICATE

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

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

RESULTS

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

*¹ Expressed as total amounts of α -BHC, β -BHC, γ -BHC and δ -BHC

*² Expressed as total amounts of op'-DDT, pp'-DDT, op'-DDD, pp'-DDD, op'-DDE and pp'-DDE

continued.

Appendix 5-2 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences

1-6-3-HAKOZAKI BLDG 4F-1 Nishinagashi na. 028K-cho Chuo-ku Tokyo 103-0015 JAPAN

TEL: 03(3)63-9521 FAX: 03(3)63-9585

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



Director

Institute for Food and Environment Sciences
TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Appendix 5-3 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences
HMAS-HAKOZAKI BLDG 4F-1 Nishiyoshihara 2-chome Chuo-Ku Tokyo 100-8015 JAPAN
TEL 03-35631998 FAX 03-3563-9665

Date : June 28, 2010

CERTIFICATE

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

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

RESULT

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



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

NOSAN

DATE Jun 7, 2010

MICROBIOLOGICAL INSPECTION

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

S.P.C. 7.9×10³ CFU/g
Coliform Group Negative
Salmonella Negative
Molds <20 CFU/g

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



Director

Appendix 5-5 Analysis of contaminants in animal

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences
IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbashi hakoza-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN
TEL 03(3663)9681 FAX 03(3663)9685

Date : September 9, 2010

CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100861
Date of Application : August 19, 2010
Date of Examination : August 19, 2010 ~ September 9, 2010
Examination No. : 261008-0044

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on August 19, 2010, we herewith report as follows :

RESULTS

Aflatoxin B ₁	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin B ₂	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G ₁	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G ₂	not detected	(detection limit 5 ppb)
Arsenic(As)	0.28 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Lead(Pb)	0.3 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Cadmium(Cd)	0.03 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Chromium(Cr)	0.8 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Mercury(Hg)	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Polychlorinatedbiphenyl(PCBs)	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Total BHC* ¹	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Parathion	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Malathion	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Total DDT* ²	not detected	(detection limit 0.05 ppm)

*¹ Expressed as total amounts of α -BHC, β -BHC, γ -BHC and δ -BHC

*² Expressed as total amounts of *op*'-DDT, *pp*'-DDT, *op*'-DDD, *pp*-DDD, *op*'-DDE and *pp*'-DDE

continued.

Appendix 5-6 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences

IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbashi-hakozaki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0016 JAPAN

TEL 03(3663)9651 FAX 03(3663)9686

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



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

Appendix 5-7 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences
IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbashi hakozaiki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN
TEL 03(3663)9681 FAX 03(3663)9685

Date : September 9, 2010

CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100861
Date of Application : August 19, 2010
Date of Examination : August 19, 2010 ~ September 9, 2010
Examination No. : 261008-0045

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on August 19, 2010, we herewith report as follows :

RESULT

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



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

NOSAN

DATE Aug 18, 2010

MICROBIOLOGICAL INSPECTION

Customer

**RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE
IN BIOCHEMISTRY AND TOXICOLOGY**

Sample Designation

LABO MR STOCK

Lot No.20100861

S.P.C. 6.5×10³ CFU/g
Coliform Group Negative
Salmonella Negative
Molds <20 CFU/g

NOSAN CORPORATION

R & D Center

Veterinary & Hygiene Service Group

5246 TAKURA, TSUKUBASHI, 300-2615 JAPAN


 **Director**

Appendix 5-9 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences
IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbaashi hakozaki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN
TEL 03(3663)9681 FAX 03(3663)9685

Date : October 5, 2010

CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100957
Date of Application : September 10, 2010
Date of Examination : September 10, 2010 ~ October 5, 2010
Examination No. : 261009-0013

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on September 10, 2010, we herewith report as follows :

RESULTS

Aflatoxin B ₁	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin B ₂	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G ₁	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G ₂	not detected	(detection limit 5 ppb)
Arsenic(As)	0.16 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Lead(Pb)	0.3 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Cadmium(Cd)	0.08 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Chromium(Cr)	0.7 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Mercury(Hg)	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Polychlorinatedbiphenyl(PCBs)	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Total BHC* ¹	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Parathion	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Malathion	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Total DDT* ²	not detected	(detection limit 0.05 ppm)

*¹ Expressed as total amounts of α -BHC, β -BHC, γ -BHC and δ -BHC

*² Expressed as total amounts of *op'*-DDT, *pp'*-DDT, *op'*-DDD, *pp'*-DDD, *op'*-DDE and *pp'*-DDE

continued.

Appendix 5-10 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences

IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbashi nakozaki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN

TEL 03(3663)9681 FAX 03(3663)0685

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



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

Appendix 5-11 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences
IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbashi hakozaki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN
TEL 03(3663)9881 FAX 03(3663)9886

Date : October 5, 2010

CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100957
Date of Application : September 10 , 2010
Date of Examination : September 10 , 2010 ~ October 5 , 2010
Examination No. : 261009-0014

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on September 10 , 2010, we herewith report as follows :

RESULT

Selenium(Se) 0.3 ppm (detection limit 0.1 ppm)



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

NOSAN

DATE Sep 13, 2010

MICROBIOLOGICAL INSPECTION

Customer

**RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE
IN BIOCHEMISTRY AND TOXICOLOGY**

Sample Designation

LABO MR STOCK

Lot No.20100957

S.P.C. <300 CFU/g
Coliform Group Negative
Salmonella Negative
Molds <20 CFU/g

NOSAN CORPORATION

R & D Center

Veterinary & Hygiene Service Group

5246 TAKURA, TSUKUBASHI, 300-2615 JAPAN



Director

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



分析レポートコード AR-10-JP-001104-01



ユーロフィンズオーダーコード EUJFTO-00000851

報告日 22.10.2010

日本チメールズ

受領

分析報告書

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

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

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

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



分析レポートコード AR-10-JP-001104-01



ユーロフィンズオーダーコード EUJPTO-00000851

J3248 乾燥減量

含水量 9.5 % 0.1

SP001 ビススロイドを含む有機塩素系農薬

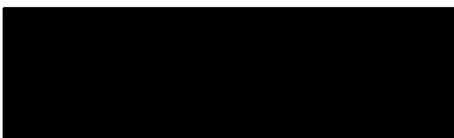
γ-BHC (リンデン)	<0.001	ppm	0.001
DDT 及び代謝物 (総計)	<0.01	ppm	
DDT, p,p'-	<0.001	ppm	0.001
DDT, o,p'-	<0.001	ppm	0.001
DDE, p,p'-	<0.002	ppm	0.002
DDE, o,p'-	<0.002	ppm	0.002
DDD, p,p'-	<0.002	ppm	0.002
DDD, o,p'-	<0.002	ppm	0.002
エンドリン	<0.002	ppm	0.002
ディルドリン	<0.001	ppm	0.001
アルドリン	<0.001	ppm	0.001
ヘプタクロル	<0.001	ppm	0.001

SP004 有機リン系農薬

パラチオン	<0.01	ppm	0.01
ダイアジノン	<0.01	ppm	0.01
馬拉チオン (馬拉ソソ)	<0.01	ppm	0.01
パラチオンメチル	<0.01	ppm	0.01

SP103 多環化 ヒフエニル

7 PCB 測定総計	<0.07	ppm	
PCB IUPAC 28	<0.01	ppm	0.01
PCB IUPAC 52	<0.01	ppm	0.01
PCB IUPAC 101	<0.01	ppm	0.01
PCB IUPAC 118	<0.01	ppm	0.01
PCB IUPAC 138	<0.01	ppm	0.01
PCB IUPAC 153	<0.01	ppm	0.01
PCB IUPAC 180	<0.01	ppm	0.01



Chemistry Customer Services Manager

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

Appendix 7 Analysis of contaminants in drinking water

Analytical Certificate of Tap water

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

Messrs. RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE IN BIOCHEMISTRY & TOXICOLOGY

TOKYO ANAL-SERVICE Co.,Ltd
8-Chomei Edogawa-ku Tokyo
Tel: 03-5621-0388 (3877)5388
Registered under No. 20.3 of the waterworks law
Registered No. 327
(Analysis of water in built facilities)
Director of analysis :
Sampling by :

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

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

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

Appendix 8-1 Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 0 mg/kg/day >

Animal number	Days of administration																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
001																														
002																														
003																														
004																														
005																														
006																														
007																														
008																														
009																														
010																														
011																														
012																														
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration													
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
001														TK
002														TK
003														TK
004														TK
005														TK
006														TK
007														TK
008														TK
009														TK
010														TK
011														TK
012														TK
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

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

Appendix 8-2 Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 6 mg/kg/day >

Animal number	Days of administration																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
013																														
014																														
015																														
016																														
017																														
018																														
019																														
020																														
021																														
022																														
023																														
024																														
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Animal number	Days of administration																													
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43																
013													TK																	
014													TK																	
015													TK																	
016													TK																	
017													TK																	
018													TK																	
019													TK																	
020													TK																	
021													TK																	
022													TK																	
023													TK																	
024													TK																	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																	

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

Appendix 8-3 Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 25 mg/kg/day >

Animal number	Days of administration																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
025																															
026																															
027																															
028																															
029																															
030																															
031	FP																														
032																															
033																															
034																															
035																															
036																															
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Animal number	Days of administration																														
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43																	
025														TK																	
026														TK																	
027														TK																	
028														TK																	
029														TK																	
030														TK																	
031	FP													TK																	
032														TK																	
033														TK																	
034														TK																	
035														TK																	
036														TK																	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																	

FP : Failed to cause pregnancy. TK : Terminal killing on day 5 after perturbation. A : Cumulative number of dead animals. B : Mortality rate (%).

Appendix 8-4 Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 100 mg/kg/day >

Animal number	Days of administration																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
037																														
038																														
039																														
040																														
041																														
042																														
043																														
044																														
045	FP																													
046																														
047																														
048																														
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration													
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
037														TK
038														TK
039														TK
040														TK
041														TK
042														TK
043														TK
044														TK
045	FP													TK
046														TK
047														TK
048														TK
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FP : Failed to cause pregnancy. TK : Terminal killing on day 5 after perturbation. A : Cumulative number of dead animals. B : Mortality rate (%).

Appendix 9-1 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 0 mg/kg/day >

Animal number	Days of administration																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
501																														
502																														
503																														
504																														
505																														
506																														
507																														
508																														
509																														
510																														
511																														
512																														
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration																														
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57			
501																															
502																															
503																															
504																															
505																															
506																															
507																															
508																															
509																															
510																															
511																															
512																															
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

TK : Terminal killing on day 5 after perturbation.

A : Cumulative number of dead animals.

B : Mortality rate (%).

Appendix 9-2 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 6 mg/kg/day >

Animal number	Days of administration																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
513																														
514																														
515 #																														
516																														
517																														
518																														
519																														
520																														
521																														
522																														
523																														
524																														
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Animal number	Days of administration																												
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	
513														TK															
514																	TK												
515 #																											TK		
516																	TK												
517																		TK											
518																			TK										
519																TK													
520														TK															
521																	TK												
522																	TK												
523														TK															
524																	TK												
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

: Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

TK : Terminal killing on day 5 after parturition. A : Cumulative number of dead animals. B : Mortality rate (%).

Appendix 9-3 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 25 mg/kg/day >

Animal number	Days of administration																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
525																													
526																													
527																													
528																													
529																													
530																													
531	NP																												
532																													
533																													
534																													
535																													
536																													
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration																												
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	
525																													TK
526																													TK
527																													TK
528														TK															
529																TK													
530																													TK
531	NP													TK															
532														TK															
533																													TK
534																													
535																TK													
536																	TK												
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TK : Terminal killing on day 5 after perturbation. NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

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

Appendix 9-4 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 100 mg/kg/day >

Animal number	KL	Days of administration																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
537	KL																													
538	KL																													
539																														
540																														
541																														
542																														
543																														
544																														
545	NP																													
546																														
547	KL																													
548	KL																													
A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	KL	Days of administration																												
		30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	
537	KL													TK																
538	KL													TK																
539															TK															
540																TK														
541																	TK													
542																		TK												
543																			TK											
544																				TK										
545	NP														TK															
546																	TK													
547	KL													TK																
548	KL													TK																
A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TK : Terminal killing on day 5 after perturbation. KL : Killed because all pups died after delivery. NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.
A : Cumulative number of dead animals. B : Mortality rate (%).

Appendix 10-1 Individual general conditions of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Fate	Days of death	General conditions (clinical signs)
0	001	TK	43	NAD
	002	TK	43	NAD
	003	TK	43	NAD
	004	TK	43	NAD
	005	TK	43	NAD
	006	TK	43	NAD
	007	TK	43	NAD
	008	TK	43	NAD
	009	TK	43	NAD
	010	TK	43	NAD
	011	TK	43	NAD
	012	TK	43	NAD
6	013	TK	43	NAD
	014	TK	43	NAD
	015	TK	43	NAD
	016	TK	43	NAD
	017	TK	43	NAD
	018	TK	43	NAD
	019	TK	43	NAD
	020	TK	43	NAD
	021	TK	43	NAD
	022	TK	43	NAD
	023	TK	43	NAD
	024	TK	43	NAD
25	025	TK	43	NAD
	026	TK	43	NAD
	027	TK	43	NAD
	028	TK	43	NAD
	029	TK	43	NAD
	030	TK	43	NAD
	031	FP TK	43	NAD
	032	TK	43	NAD
	033	TK	43	NAD
	034	TK	43	NAD
	035	TK	43	NAD
	036	TK	43	NAD

TK : Terminal killing.

NAD : No abnormalities were detected.

FP : Failed to cause pregnancy.

Appendix 10-2 Individual general conditions of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Fate	Days of death	General conditions (clinical signs)
100	037	TK	43	Salivation + (25) ^a
	038	TK	43	Salivation + (23-25 , 30 , 36) ^a
	039	TK	43	NAD
	040	TK	43	Salivation + (7 , 8 , 15-17 , 19 , 21-23 , 25-42) ^a
	041	TK	43	Salivation + (7 , 9 , 15 , 22 , 24 , 25 , 30 , 32 , 37) ^a
	042	TK	43	Salivation + (7 , 10-17 , 22-25 , 27-32 , 34-42) ^a Soiled perineal region + (7 , 8) ^a
	043	TK	43	Salivation + (6 , 22 , 23 , 25 , 28-31 , 36) ^a
	044	TK	43	Salivation + (7-9 , 12 , 14 , 18 , 22-25 , 29 , 30 , 32 , 33 , 39 , 42) ^a
	045	FP TK	43	Salivation + (23 , 25 , 39) ^a
	046	TK	43	Salivation + (10-25 , 28-42) ^a
	047	TK	43	Salivation + (22-25 , 27-38 , 41 , 42) ^a
	048	TK	43	Salivation + (6 , 10-12 , 14-42) ^a Smudge around mouth nose + (3 , 4 , 6-8 , 10) ^a

TK : Terminal killing.

FP : Failed to cause pregnancy.

a : Experimental day when the sign was observed.

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

Appendix 11-1 Individual general conditions of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Fate	Days of death	General conditions (clinical signs)
0	501	TK	47	NAD
	502	TK	47	NAD
	503	TK	44	NAD
	504	TK	57	NAD
	505	TK	45	NAD
	506	TK	43	NAD
	507	TK	44	NAD
	508	TK	46	NAD
	509	TK	47	NAD
	510	TK	44	NAD
	511	TK	45	NAD
	512	TK	44	NAD
6	513	TK	43	NAD
	514	TK	46	NAD
	515 #	TK	56	NAD
	516	TK	46	NAD
	517	TK	47	NAD
	518	TK	46	NAD
	519	TK	45	NAD
	520	TK	43	NAD
	521	TK	46	NAD
	522	TK	46	NAD
	523	TK	43	NAD
	524	TK	46	NAD
25	525	TK	47	NAD
	526	TK	47	NAD
	527	TK	47	NAD
	528	TK	43	NAD
	529	TK	45	NAD
	530	TK	47	NAD
	531 NP	TK	43	NAD
	532	TK	43	NAD
	533	TK	47	NAD
	534	TK	45	NAD
	535	TK	44	NAD
	536	TK	45	NAD

TK : Terminal killing on day 5 after perturbation.

NAD : No abnormalities were detected.

: Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Appendix 11-2 Individual general conditions of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Fate	Days of death	General conditions (clinical signs)
100	537	KL	42	Salivation + (6-14 , 31 , 37) ^a
	538	KL	43	Salivation + (13 , 15-17 , 21 , 33 , 41 , 42) ^a
	539	TK	44	Salivation + (11 , 29) ^a
	540	TK	45	Salivation + (4 , 6 , 10-13 , 16-20 , 22 , 23 , 26-28 , 31-34 , 38) ^a
	541	TK	46	Salivation + (6 , 8 , 11 , 12 , 14 , 16 , 17 , 22 , 26 , 32 , 34 , 36 , 42) ^a
	542	TK	47	Salivation + (3 , 4 , 6-10 , 13-15 , 21 , 30 , 41) ^a
	543	TK	47	Salivation + (4 , 6-8 , 10 , 11 , 14 , 15 , 21-23 , 25 , 30 , 39-42) ^a
	544	TK	45	NAD
	545 NP	TK	43	Salivation + (7 , 8 , 10) ^a
	546	TK	45	Salivation + (8-18 , 22 , 23 , 30 , 33 , 35 , 38) ^a
	547	KL	42	Salivation + (13 , 14 , 25) ^a
	548	KL	42	Salivation + (10 , 11 , 13-15 , 17 , 22 , 23 , 25 , 31) ^a

TK : Terminal killing on day 5 after perturbation.

+ : Slight.

a : Experimental day when the sign was observed.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

KL : Killed because all pups died after delivery.

Individual body weights of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene
in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Days of the administration period							Gain 1~42
		1	7	14	21	28	35	42	
0	001	363	379	412	421	449	471	482	119
	002	372	403	436	455	485	500	516	144
	003	377	407	430	441	467	492	510	133
	004	381	410	442	471	505	521	538	157
	005	380	394	422	453	492	518	544	164
	006	381	408	428	446	478	495	522	141
	007	388	416	438	446	486	506	518	130
	008	392	428	461	487	504	522	538	146
	009	392	431	462	478	500	520	534	142
	010	399	425	449	471	498	514	541	142
	011	391	427	466	487	525	539	569	178
	012	398	430	458	480	515	535	554	156
		Mean	385	413	442	461	492	511	531
6	013	366	385	413	446	469	494	523	157
	014	373	391	426	449	476	492	512	139
	015	377	399	429	457	470	489	511	134
	016	377	406	428	448	477	495	508	131
	017	387	406	440	450	481	502	524	137
	018	386	398	425	423	443	467	490	104
	019	389	400	425	441	477	501	526	137
	020	392	431	459	477	491	525	557	165
	021	391	417	440	469	495	513	539	148
	022	400	432	470	487	517	548	571	171
	023	401	432	450	477	509	535	562	161
	024	407	442	471	488	512	538	561	154
		Mean	387	412	440	459	485	508	532

Individual body weights of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene
in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Days of the administration period							Gain 1~42	
		1	7	14	21	28	35	42		
25	025	360	386	414	432	458	482	498	138	
	026	368	380	400	414	442	470	487	119	
	027	376	396	421	444	467	495	509	133	
	028	380	396	429	470	503	532	541	161	
	029	381	384	420	442	467	482	502	121	
	030	386	397	421	458	488	518	531	145	
	031	FP	382	383	407	452	488	524	545	163
	032		395	395	430	455	493	533	557	162
	033		391	387	431	458	476	503	515	124
	034		394	397	423	449	486	512	531	137
	035		400	405	436	471	497	517	537	137
	036		413	432	471	492	520	539	556	143
		Mean	386	395	425	453	482	509	526	140
100	037	373	365	390	414	431	459	465	92	
	038	377	362	392	423	441	463	487	110	
	039	373	365	406	440	461	471	487	114	
	040	383	375	408	440	475	519	541	158	
	041	382	384	407	445	467	486	506	124	
	042	387	297	376	418	433	453	462	75	
	043	383	357	400	440	459	480	498	115	
	044	393	385	429	457	488	516	538	145	
	045	FP	396	388	423	442	461	502	522	126
	046		391	384	441	478	498	517	546	155
	047		399	381	419	448	464	486	507	108
	048		419	358	415	462	489	529	555	136
		Mean	388	367	409	442	464	490	510	122

FP : Failed to cause pregnancy.

Appendix 13-1

Individual body weights of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Days of the pre-mating			Gain 1~14	Days of the pregnancy				Gain 0~20	Days of the lactation		Gain 0~4
		1	7	14		0	7	14	20		0	4	
0	501	218	218	234	16	253	296	344	424	171	338	349	11
	502	226	234	249	23	261	284	315	394	133	275	315	40
	503	231	247	255	24	272	298	348	467	195	313	346	33
	504	235	239	257	22	299	320	334	384	85	326	349	23
	505	233	241	248	15	267	309	346	430	163	336	368	32
	506	236	235	254	18	262	313	360	467	205	339	362	23
	507	230	251	260	30	259	299	340	421	162	310	354	44
	508	234	246	251	17	263	295	334	412	149	297	340	43
	509	249	254	275	26	279	312	333	402	123	319	356	37
	510	245	261	273	28	286	317	355	454	168	320	351	31
	511	256	271	274	18	288	320	358	436	148	338	346	8
	512	261	263	285	24	291	331	368	484	193	337	376	39
	Mean	238	247	260	22	273	308	345	431	158	321	351	30
6	513	214	230	249	35	259	296	333	415	156	324	335	11
	514	232	237	238	6	261	292	326	396	135	279	337	58
	515 #	232	233	252	20	—	—	—	—	—	286	337	51
	516	232	234	242	10	219	218	238	278	59	205	208	3
	517	238	238	257	19	273	312	344	379	106	334	339	5
	518	239	239	261	22	265	302	341	421	156	298	317	19
	519	233	252	259	26	271	298	330	408	137	293	351	58
	520	251	254	272	21	273	325	371	450	177	365	383	18
	521	246	254	260	14	274	298	334	421	147	278	324	46
	522	252	249	263	11	280	323	365	478	198	334	374	40
	523	249	251	277	28	265	318	363	461	196	326	361	35
	524	257	252	255	-2	292	331	371	469	177	306	327	21
	Mean	240	244	257	18	267	301	338	416	149	302	333	30

: Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

Appendix 13-2

Individual body weights of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Days of the pre-mating			Gain 1~14	Days of the pregnancy				Gain 0~20	Days of the lactation		Gain 0~4	
		1	7	14		0	7	14	20		0	4		
25	525		231	221	240	9	264	309	343	410	146	326	341	15
	526		227	219	242	15	255	292	314	388	133	271	300	29
	527		229	226	245	16	255	289	320	398	143	280	322	42
	528		232	242	254	22	253	279	310	381	128	305	313	8
	529		224	235	241	17	275	317	361	462	187	334	380	46
	530		233	227	254	21	259	299	329	411	152	309	343	34
	531	NP	245	240	269	24	(270)	(261)	(317)	(303)	(33)	—	—	—
	532		247	252	275	28	263	305	341	425	162	306	341	35
	533		251	246	269	18	279	314	353	435	156	328	358	30
	534		235	252	269	34	266	299	338	413	147	286	323	37
	535		255	265	290	35	286	335	371	473	187	318	364	46
	536		264	267	284	20	297	337	378	465	168	344	376	32
		Mean		239	241	261	22	268	307	342	424	155	310	342
100	537	KL	228	227	247	19	227	276	312	364	137	272	—	—
	538	KL	228	222	235	7	242	266	293	351	109	258	—	—
	539		220	222	235	15	249	278	299	373	124	274	292	18
	540		234	227	240	6	249	294	315	391	142	289	320	31
	541		230	237	255	25	256	294	311	385	129	285	299	14
	542		234	238	260	26	271	316	327	416	145	308	315	7
	543		244	235	256	12	282	304	326	397	115	283	303	20
	544		250	251	287	37	285	327	356	401	116	310	322	12
	545	NP	248	256	271	23	(277)	(320)	(337)	(324)	(47)	—	—	—
	546		254	243	266	12	263	299	318	387	124	265	284	19
	547	KL	246	246	274	28	266	321	332	334	68	308	—	—
548	KL	250	242	286	36	284	295	310	414	130	287	—	—	
	Mean		239	237	259	21	261	297	318	383	122	285	305	17

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

() : Not included in statistics.

KL : Killed because all pups died after delivery.

Individual food consumption of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Days of the admnistration						
		1	7	14	21	28	35	41
0	001	28	30	31	33	34	31	34
	002	30	33	33	34	29	32	35
	003	32	31	28	35	32	33	29
	004	32	33	35	—	—	36	36
	005	28	26	29	33	32	32	34
	006	37	32	32	33	33	34	33
	007	34	36	33	35	37	34	35
	008	33	34	33	35	33	37	33
	009	38	38	32	34	32	33	34
	010	32	35	35	34	33	32	38
	011	40	40	34	37	36	36	37
	012	37	33	32	34	34	35	36
	Mean	33	33	32	34	33	34	35
6	013	26	29	32	33	35	36	34
	014	30	28	31	32	31	29	32
	015	31	32	37	—	—	33	36
	016	33	34	37	33	35	35	37
	017	35	31	36	36	33	35	31
	018	35	31	31	32	32	32	33
	019	31	32	28	37	36	36	34
	020	38	38	33	35	30	36	37
	021	33	30	29	34	32	33	29
	022	32	33	33	39	34	32	38
	023	33	35	33	36	37	38	39
	024	35	35	33	40	36	36	37
	Mean	33	32	33	35	34	34	35

— : Could not for mating.

Individual food consumption of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Days of the administration							
		1	7	14	21	28	35	41	
25	025	32	31	34	38	35	32	35	
	026	32	27	29	36	34	36	35	
	027	35	33	37	39	38	36	36	
	028	35	33	33	37	34	33	35	
	029	32	32	34	34	33	31	37	
	030	28	30	32	37	34	33	38	
	031	FP	26	31	32	38	37	38	37
	032	31	30	33	36	36	35	31	
	033	22	35	34	38	33	32	33	
	034	25	34	33	38	37	34	35	
	035	32	33	34	38	35	35	35	
	036	31	33	35	36	33	35	32	
		Mean	30	32	33	37	35	34	35
100	037	25	31	35	32	38	38	34	
	038	28	25	32	35	26	37	38	
	039	30	35	33	33	35	32	33	
	040	23	23	35	37	37	35	41	
	041	30	24	34	40	38	35	40	
	042	25	26	35	33	31	30	30	
	043	32	40	36	39	40	39	39	
	044	27	32	33	36	36	38	37	
	045	FP	30	33	33	29	36	39	38
	046	31	37	38	34	36	36	39	
	047	30	36	36	35	34	38	40	
048	26	40	42	31	37	37	38		
	Mean	28	32	35	35	35	36	37	

FP : Failed to cause pregnancy.

Appendix 15-1 Individual food consumption of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	(g/rat/day)								
		Days of the pre-mating			Days of the pregnancy				Days of the lactation	
		1	7	14	0	7	14	20	0	3
0	501	21	22	20	23	32	30	30	33	53
	502	23	23	18	16	22	25	25	32	49
	503	25	19	27	13	29	32	31	26	55
	504	22	21	18	18	22	23	25	18	39
	505	22	26	25	22	24	27	30	32	51
	506	23	23	19	15	27	30	29	14	60
	507	25	23	24	15	27	25	37	29	47
	508	22	24	21	15	25	24	27	33	64
	509	29	24	18	20	18	28	27	26	47
	510	26	26	26	20	28	33	32	13	52
	511	21	24	22	16	27	26	29	21	48
	512	18	25	25	15	30	27	28	21	59
	Mean	23	23	22	17	26	28	29	25	52
6	513	22	19	26	18	26	30	32	29	51
	514	24	23	24	16	26	24	25	23	62
	515	#	23	18	—	—	—	—	25	59
	516		19	26	24	18	12	32	49	12
	517		22	26	17	18	21	25	28	16
	518		22	23	20	23	28	24	28	9
	519		25	23	24	22	29	33	37	31
	520		25	19	24	15	25	27	19	34
	521		17	23	23	23	23	33	30	17
	522		25	24	20	18	28	31	26	22
	523		17	26	21	21	10	31	12	22
	524		26	27	20	23	17	27	30	3
	Mean	22	24	22	20	22	29	27	23	50

: Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

Appendix 15-2 Individual food consumption of female rats treated orally with 1,3-Dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Days of the pre mating			Days of the pregnancy				Days of the lactation		
		1	7	14	0	7	14	20	0	3	
25	525	19	24	18	23	17	27	30	31	56	
	526	19	23	17	17	25	28	21	14	44	
	527	23	23	17	19	21	26	25	29	52	
	528	22	21	24	17	25	25	29	6	53	
	529	16	21	21	17	29	29	36	36	61	
	530	19	24	26	17	24	27	24	39	57	
	531	NP	23	28	19	(13)	(22)	(30)	(17)	—	—
	532	23	26	26	17	24	29	27	16	49	
	533	21	25	23	15	23	28	27	32	53	
	534	22	26	25	18	32	26	29	7	39	
	535	25	21	26	21	29	32	29	16	53	
	536	16	26	27	22	30	29	31	20	52	
		Mean	21	24	22	18	25	28	28	22	52
100	537	KL	16	20	26	21	23	21	27	16	—
	538	KL	21	21	23	12	22	27	29	—	—
	539	18	19	25	15	22	19	29	16	42	
	540	21	28	25	10	32	26	35	11	39	
	541	16	24	26	18	23	26	24	16	30	
	542	20	24	18	24	26	30	30	8	34	
	543	21	19	21	17	23	29	25	6	27	
	544	21	24	25	19	30	24	29	11	23	
	545	NP	22	18	28	(12)	(23)	(24)	(24)	—	—
	546	17	25	27	17	29	22	22	6	22	
	547	KL	18	19	23	18	29	27	30	21	—
548	KL	22	25	24	11	30	23	21	1	—	
	Mean	19	22	24	17	26	25	27	11	31	

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

() : Not included in statistics.

KL : Killed because all pups died after delivery.

Appendix 16-1 Individual pathological findings of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal Fate number	Necropsy		Histology
0	001	NAD	a Liver	: Microgranuloma +
			Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium + (α -2u-globulin immno-stain : Positive; PAS reaction : Negative)
			Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	002	NAD	a Liver	: Microgranuloma +
			Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
			Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary +
			Prostate	: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +
	003	NAD	a Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium + (α -2u-globulin immno-stain : Positive; PAS reaction : Negative)
			Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary +
	004	Testis : Small, both side +	a Liver	: Microgranuloma +
			Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
			Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
			Testis	: Atrophy, seminiferous tubule ++
	005	NAD	a Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium + Dilatation, distal/collecting tubules +
			Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	006	NAD	a Liver	: Microgranuloma +
			Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium + Dilatation, distal/collecting tubules +
			Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
			Prostate	: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

++ : Moderate.

a : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

Appendix 16-2 Individual pathological findings of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal Fate number	Necropsy		Histology
0 (Continued)	007	NAD	a Kidney Spleen	: Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	008	NAD	a Liver Kidney Spleen	: Microgranuloma + : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium + Basophilic tubule + Cellular infiltration, lymphocyte, cortex + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	009	Spleen : Enlargement +	a Liver Kidney Spleen	: Microgranuloma + : Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary +++ Deposit, pigment, brown +++
	010	NAD	a Liver Kidney Spleen	: Microgranuloma + : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium + Basophilic tubule + Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	011	NAD	a Liver Kidney Spleen	: Microgranuloma + : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium + Basophilic tubule + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	012	NAD	a Liver Spleen Prostate	: Microgranuloma + : Hematopoiesis, extramedullary + : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

+++ : Severe.

a : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

Appendix 16-3 Individual pathological findings of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy	Histology
6	013	NAD	c Liver : Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
	014	NAD	c Liver : Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
	015	NAD	c Liver : Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
	016	NAD	c NAD
	017	NAD	c Liver : Necrosis, focal + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium ++
	018	NAD	c Liver : Microgranuloma + Proliferation, bile duct, focal + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
	019	NAD	c Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
	020	NAD	c Kidney : Dilatation, distal/collecting tubules +
	021	NAD	c Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
	022	NAD	c Liver : Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
	023	NAD	c NAD
	024	NAD	c Liver : Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +

NAD : No abnormalities were detected.
+ : Slight.
++ : Moderate.
c : Organs of the liver and kidney were examined.

Appendix 16-4 Individual pathological findings of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy	Histology
25	025	NAD	c Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium ++
	026	NAD	c Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium ++ Basophilic tubule +
	027	NAD	c Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
	028	NAD	c Liver : Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium ++
	029	NAD	c Liver : Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +
	030	NAD	c Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium + Basophilic tubule +
	031	FP	e Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium ++
	032	NAD	c Liver : Necrosis, focal + Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium ++
	033	NAD	c Liver : Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++
	034	NAD	c Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ Basophilic tubule +
	035	NAD	c Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium ++
	036	NAD	c Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium + Dilatation, distal/collecting tubules +

- FP : Failed to cause pregnancy.
 NAD : No abnormalities were detected.
 + : Slight.
 ++ : Moderate.
 +++ : Severe.
 c : Organs of the liver and kidney were examined.
 e : Organs of the liver, kidney, pituitary, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

Appendix 16-5 Individual pathological findings of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy		Histology
100	037	NAD	a Liver	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular +
			Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ Basophilic tubule + Dilatation, distal/collecting tubules +
			Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary +
			Prostate	: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +
038	NAD	a Liver	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular +	
		Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++	
		Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +	
039	NAD	a Liver	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma +	
		Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ Dilatation, distal/collecting tubules +	
		Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +	
040	NAD	a Liver	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma +	
		Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ Basophilic tubule ++ Dilatation, distal/collecting tubules +	
		Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +	

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

++ : Moderate.

+++ : Severe.

a : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

Appendix 16-6 Individual pathological findings of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy		Histology
100 (Continued)	041	Liver : Enlargement +	a	Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ Basophilic tubule ++ Dilatation, distal/collecting tubules + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	042	NAD	a	Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ Basophilic tubule ++ Dilatation, distal/collecting tubules + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	043	NAD	a	Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ (α -2u-globulin immno-stain : Positive; PAS reaction : Negative) Dilatation, distal/collecting tubules + Thymus : Atrophy, cortical + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	044	NAD	a	Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ (α -2u-globulin immno-stain : Positive; PAS reaction : Negative) Basophilic tubule ++ Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

++ : Moderate.

+++ : Severe.

a : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

Appendix 16-7 Individual pathological findings of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number		Necropsy		Histology
100 (Continued)	045	FP	Kidney : Enlargement, both side +	e	Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ Dilatation, distal/collecting tubules + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	046		Liver : Enlargement + Kidney : Enlargement, both side +	a	Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular ++ Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ Dilatation, distal/collecting tubules + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown + Testis : Atrophy, seminiferous tubule +
	047		Liver : Enlargement +	a	Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ Basophilic tubule + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown + Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +
	048		NAD	a	Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium +++ Basophilic tubule ++ Cellular infiltration, lymphocyte, cortex + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +

- FP : Failed to cause pregnancy.
 NAD : No abnormalities were detected.
 + : Slight.
 ++ : Moderate.
 +++ : Severe.
 a : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.
 e : Organs of the liver, kidney, pituitary, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

Appendix 16-8 The number of cells in seminiferous epithelia assessed by the individual examination 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal No.	Stage II-III			Stage V			Stage VII			Stage X II	
		G	P	T	G	P	T	G	R/P	T	G	Z/P
0	001	0.52	2.15	6.52	0.60	2.25	6.43	0.05	3.15	6.25	0.07	4.40
	002	0.46	1.64	4.96	0.59	1.99	6.21	0.06	2.87	6.27	0.06	3.98
	003	0.50	1.77	6.19	0.63	1.91	6.15	0.08	3.08	6.25	0.05	4.29
	004	j (0.34)	(2.23)	(5.07)	(1.16)	(2.49)	(6.68)	(0.07)	(3.47)	(5.61)	(0.08)	(5.03)
	005	0.40	1.84	6.15	0.61	1.85	5.59	0.05	2.90	6.34	0.06	4.16
	006	0.47	1.83	5.45	0.63	1.78	6.20	0.05	2.78	5.93	0.06	3.90
	007	0.49	1.64	5.00	0.57	1.69	5.60	0.06	3.16	5.72	0.05	4.39
	008	0.37	1.73	5.56	0.53	1.69	5.92	0.05	3.07	6.38	0.06	4.26
	009	0.50	2.03	5.10	0.66	1.90	6.09	0.05	3.38	6.48	0.05	4.09
	010	0.35	1.71	6.15	0.63	1.93	5.73	0.07	2.99	5.94	0.05	4.22
	011	0.36	1.96	5.57	0.66	1.83	5.86	0.06	2.86	6.32	0.05	3.91
	012	0.41	1.72	5.51	0.62	1.91	6.23	0.06	2.89	5.54	0.06	3.98
		Mean	0.44	1.82	5.65	0.61	1.88	6.00	0.06	3.01	6.13	0.06
100	037	0.66	1.47	6.19	0.56	2.19	5.76	0.05	2.79	6.32	0.08	4.74
	038	0.48	1.66	6.49	0.61	1.85	6.01	0.05	2.77	5.59	0.07	4.56
	039	0.43	1.75	6.22	0.63	1.81	5.55	0.05	3.16	6.34	0.07	4.11
	040	0.49	2.01	6.26	0.67	1.75	6.25	0.05	3.13	6.24	0.07	4.70
	041	0.44	2.05	5.55	0.66	1.83	5.60	0.05	3.12	5.92	0.06	4.39
	042	0.46	1.59	5.65	0.55	1.83	5.33	0.05	3.20	5.85	0.07	3.68
	043	0.38	1.66	5.14	0.67	1.69	6.41	0.06	2.78	5.17	0.06	3.94
	044	0.34	1.67	5.01	0.65	1.88	6.55	0.06	2.89	6.27	0.06	4.52
	045	0.42	1.78	5.31	0.63	1.83	5.53	0.05	2.99	5.98	0.05	4.22
	046	0.45	2.06	6.79	0.67	1.99	6.11	0.05	2.83	6.24	0.06	4.97
	047	0.46	1.72	5.94	0.70	1.79	5.67	0.05	3.04	5.38	0.08	3.77
	048	0.47	1.74	5.50	0.67	1.64	5.39	0.06	2.64	5.04	0.06	4.00
		Mean	0.46	1.76	5.84	0.64	1.84	5.85	0.05	2.95	5.86	0.07

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

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

() : Not included in statistics.

j : The animal with a macroscopic abnormality in testes.

Appendix 17-1 Individual pathological findings of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal Fate number	Necropsy		Histology
0	501	NAD	b Kidney Spleen	: Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	502	NAD	b Liver Kidney Spleen	: Microgranuloma + : Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	503	NAD	b Liver Spleen	: Microgranuloma + : Hematopoiesis, extramedullary +
	504	NAD	b Liver Kidney Spleen	: Microgranuloma + : Basophilic tubule + Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	505	NAD	b Liver Spleen	: Microgranuloma + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	506	NAD	b Liver Kidney Spleen	: Microgranuloma + : Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	507	NAD	b Kidney Spleen	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium + Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

b : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, ovary and uterus were examined.

Appendix 17-2 Individual pathological findings of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal Fate number	Necropsy		Histology
0 (Continued)	508	NAD	b Liver Spleen	: Microgranuloma + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	509	NAD	b Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary +
	510	NAD	b Liver Spleen	: Microgranuloma + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	511	NAD	b Kidney Spleen	: Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	512	NAD	b Liver Kidney Spleen	: Microgranuloma + : Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

b : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, ovary and uterus were examined.

Appendix 17-3 Individual pathological findings of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal Fate number	Necropsy		Histology
6	513	NAD	d	NAD
	514	NAD	d Liver	: Necrosis, focal +
	515 j	NAD	d	NAD
	516	Mammary gland : Immatureness +	d Mammary ⁱ gland	: Hypoplasia +
	517	NAD	d	NAD
	518	NAD	d	NAD
	519	NAD	d Liver	: Necrosis, focal +
	520	NAD	d	NAD
	521	NAD	d	NAD
	522	NAD	d Liver	: Necrosis, focal +
	523	NAD	d	NAD
	524	NAD	d	NAD

- NAD : No abnormalities were detected.
+ : Slight.
d : Organ of the liver was examined.
i : Examined the animal with a macroscopic abnormality.
j : Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

Appendix 17-4 Individual pathological findings of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy		Histology
25	525	NAD	d	NAD
	526	NAD	d	NAD
	527	NAD	d Liver	: Microgranuloma +
	528	NAD	d Liver	: Microgranuloma +
	529	NAD	d	NAD
	530	NAD	d Liver	: Necrosis, focal +
	531 NP	NAD	f	NAD
	532	NAD	d	NAD
	533	NAD	d Liver	: Proliferation, bile duct, focal +
	534	NAD	d	NAD
	535	NAD	d	NAD
	536	NAD	d	NAD

- NP : Non-pregnant.
 NAD : No abnormalities were detected.
 + : Slight.
 d : Organ of the liver was examined.
 f : Organs of the liver, pituitary, ovary and uterus and were examined.

Appendix 17-5 Individual pathological findings of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy	Histology
100	537 KL	NAD	g Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Kidney : Dilatation, distal/collecting tubules + Thymus : Atrophy, cortical + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	538 KL	NAD	g Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	539	NAD	b Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	540	NAD	b Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Kidney : Dilatation, distal/collecting tubules + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	541	NAD	b Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Kidney : Basophilic tubule + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +

KL : Killed because all pups died after delivery.

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

b : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, ovary and uterus were examined.

g : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, pituitary, ovary, uterus and mammary gland were examined.

Appendix 17-6 Individual pathological findings of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy		Histology
100 (Continued)	542	NAD	b Liver Spleen	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +
	543	NAD	b Liver Spleen	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + : Hematopoiesis, extramedullary +
	544	Mammary gland : Immatureness +	b Liver Kidney Spleen Mammary ¹ gland	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma + : Dilatation, distal/collecting tubules + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown + : Hypoplasia +
	545	NP	h Liver Spleen	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown ++
	546	NAD	b Liver Spleen	: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma + : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown +

- NP : Non-pregnant.
 NAD : No abnormalities were detected.
 + : Slight.
 ++ : Moderate.
 b : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, ovary and uterus were examined.
 h : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, pituitary, ovary and uterus were examined.
 i : Examined the animal with a macroscopic abnormality.

Appendix 17-7 Individual pathological findings of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number		Necropsy		Histology
100 (Continued)	547	KL	NAD	g	Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown ++ Mammary gland : Hypoplasia +
	548	KL	NAD	g	Liver : Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + Microgranuloma + Kidney : Dilatation, distal/collecting tubules + Spleen : Hematopoiesis, extramedullary + Deposit, pigment, brown ++

KL : Killed because all pups died after delivery.

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

++ : Moderate.

g : Organs of the liver, kidney, thymus, spleen, pituitary, ovary, uterus and mammary gland were examined.

Appendix 18-1

Individual absolute organ weights of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Thymus (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Prostate (g)	Seminal vesicle (g)	Testis (g)	Epididymis (g)	Kidney (g)
0	001		449	0.32	12.16	0.75	1.17	2.58	3.17	1.36	2.70
	002		475	0.34	11.32	0.93	0.53	2.01	3.34	1.54	3.05
	003		474	0.27	11.97	0.77	0.57	2.46	3.21	1.23	3.64
	004		496	0.22	11.11	0.65	0.78	2.22	2.32	1.12	2.93
	005		510	0.42	12.97	1.08	1.16	2.76	3.10	1.56	3.70
	006		475	0.39	12.54	0.85	0.90	2.38	3.35	1.56	2.93
	007		473	0.33	11.49	0.86	0.74	2.19	3.39	1.21	2.88
	008		494	0.38	11.94	0.68	0.52	2.35	3.69	1.43	2.55
	009		503	0.30	12.41	1.20	0.78	2.48	3.52	1.43	3.04
	010		495	0.49	11.39	0.85	0.96	2.15	3.54	1.66	2.78
	011		527	0.36	14.26	1.12	0.80	2.77	3.70	1.43	2.91
	012		518	0.51	12.33	0.90	0.53	2.89	3.47	1.50	2.88
	Mean		491	0.36	12.16	0.89	0.79	2.44	3.32	1.42	3.00
6	013		484	0.41	11.63	1.01	0.94	2.39	3.63	1.60	3.65
	014		470	0.29	11.21	0.74	0.77	2.33	3.18	1.35	2.81
	015		469	0.35	11.96	0.90	0.52	1.95	3.29	1.50	3.33
	016		470	0.25	12.95	0.72	0.67	2.36	3.07	1.22	2.86
	017		480	0.60	13.22	0.99	1.15	2.64	3.02	1.44	3.10
	018		453	0.37	12.16	0.75	1.00	2.47	3.53	1.31	2.94
	019		479	0.34	11.73	0.77	0.67	2.77	3.17	1.46	2.72
	020		516	0.30	13.52	0.84	0.75	2.73	2.98	1.36	3.11
	021		499	0.48	11.33	0.92	0.76	2.40	2.83	1.40	2.33
	022		530	0.41	12.57	1.01	0.83	2.93	3.79	1.48	3.09
	023		524	0.36	14.02	0.99	0.68	2.67	3.56	1.45	3.37
	024		521	0.39	12.88	0.85	1.00	3.07	3.41	1.57	3.82
	Mean		491	0.38	12.43	0.87	0.81	2.56	3.29	1.43	3.09

Appendix 18-2

Individual absolute organ weights of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Thymus (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Prostate (g)	Seminal vesicle (g)	Testis (g)	Epididymis (g)	Kidney (g)
25	025		460	0.54	12.05	1.09	0.85	1.95	2.95	1.47	2.95
	026		456	0.42	12.28	0.84	0.85	2.26	3.59	1.46	2.96
	027		473	0.24	13.51	0.79	0.66	2.14	3.47	1.33	3.20
	028		502	0.28	13.85	0.84	0.80	2.54	3.02	1.52	3.59
	029		493	0.35	11.81	0.82	1.05	2.75	3.52	1.47	3.17
	030		492	0.37	13.59	0.72	0.59	2.20	3.43	1.34	3.16
	031	FP	506	0.25	13.46	0.88	0.65	2.27	3.80	1.57	3.37
	032		524	0.29	14.62	0.85	0.54	1.99	3.23	1.26	3.18
	033		487	0.38	13.11	0.67	0.52	2.19	3.39	1.21	3.00
	034		492	0.31	15.38	1.01	0.67	2.05	3.27	1.15	3.26
	035		498	0.26	12.80	0.90	0.92	3.16	3.65	1.25	3.86
	036		511	0.33	14.97	0.82	0.77	2.53	3.38	1.39	3.68
		Mean		491	0.34	13.45	0.85	0.74	2.34	3.39	1.37
100	037		432	0.26	13.18	0.71	1.16	2.21	3.40	1.37	3.27
	038		446	0.24	13.99	0.53	0.67	2.42	3.02	1.03	3.15
	039		448	0.31	15.48	0.63	0.58	2.19	3.75	1.19	3.58
	040		485	0.36	16.25	0.69	0.61	3.01	3.48	1.41	3.68
	041		463	0.31	17.19	0.63	0.72	2.61	3.40	1.23	3.87
	042		429	0.34	12.57	0.58	0.78	2.71	3.13	1.30	3.01
	043		463	0.26	16.99	0.70	0.73	2.08	3.16	1.16	3.50
	044		502	0.24	16.70	0.92	0.52	2.30	2.95	0.96	3.53
	045	FP	481	0.21	15.24	0.85	0.65	2.75	3.30	1.29	4.01
	046		496	0.32	18.56	0.73	0.55	2.36	3.25	1.21	4.10
047		465	0.24	17.12	0.68	0.60	2.69	3.24	1.04	3.54	
048		502	0.35	15.84	0.64	0.65	2.58	3.35	1.16	3.39	
	Mean		468	0.29	15.76	0.69	0.69	2.49	3.29	1.20	3.55

FP : Failed to cause pregnancy.

Appendix 19-1

Individual relative organ weights of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Thymus (%)	Liver (%)	Spleen (%)	Prostate (%)	Seminal vesicle (%)	Testis (%)	Epididymis (%)	Kidney (%)
0	001		449	0.07	2.71	0.17	0.26	0.57	0.71	0.30	0.60
	002		475	0.07	2.38	0.20	0.11	0.42	0.70	0.32	0.64
	003		474	0.06	2.53	0.16	0.12	0.52	0.68	0.26	0.77
	004		496	0.04	2.24	0.13	0.16	0.45	0.47	0.23	0.59
	005		510	0.08	2.54	0.21	0.23	0.54	0.61	0.31	0.73
	006		475	0.08	2.64	0.18	0.19	0.50	0.71	0.33	0.62
	007		473	0.07	2.43	0.18	0.16	0.46	0.72	0.26	0.61
	008		494	0.08	2.42	0.14	0.11	0.48	0.75	0.29	0.52
	009		503	0.06	2.47	0.24	0.16	0.49	0.70	0.28	0.60
	010		495	0.10	2.30	0.17	0.19	0.43	0.72	0.34	0.56
	011		527	0.07	2.71	0.21	0.15	0.53	0.70	0.27	0.55
	012		518	0.10	2.38	0.17	0.10	0.56	0.67	0.29	0.56
	Mean		491	0.07	2.48	0.18	0.16	0.50	0.68	0.29	0.61
6	013		484	0.08	2.40	0.21	0.19	0.49	0.75	0.33	0.75
	014		470	0.06	2.39	0.16	0.16	0.50	0.68	0.29	0.60
	015		469	0.07	2.55	0.19	0.11	0.42	0.70	0.32	0.71
	016		470	0.05	2.76	0.15	0.14	0.50	0.65	0.26	0.61
	017		480	0.13	2.75	0.21	0.24	0.55	0.63	0.30	0.65
	018		453	0.08	2.68	0.17	0.22	0.55	0.78	0.29	0.65
	019		479	0.07	2.45	0.16	0.14	0.58	0.66	0.30	0.57
	020		516	0.06	2.62	0.16	0.15	0.53	0.58	0.26	0.60
	021		499	0.10	2.27	0.18	0.15	0.48	0.57	0.28	0.47
	022		530	0.08	2.37	0.19	0.16	0.55	0.72	0.28	0.58
	023		524	0.07	2.68	0.19	0.13	0.51	0.68	0.28	0.64
	024		521	0.07	2.47	0.16	0.19	0.59	0.65	0.30	0.73
	Mean		491	0.08	2.53	0.18	0.17	0.52	0.67	0.29	0.63

Appendix 19-2

Individual relative organ weights of male rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Thymus (%)	Liver (%)	Spleen (%)	Prostate (%)	Seminal vesicle (%)	Testis (%)	Epididymis (%)	Kidney (%)
25	025		460	0.12	2.62	0.24	0.18	0.42	0.64	0.32	0.64
	026		456	0.09	2.69	0.18	0.19	0.50	0.79	0.32	0.65
	027		473	0.05	2.86	0.17	0.14	0.45	0.73	0.28	0.68
	028		502	0.06	2.76	0.17	0.16	0.51	0.60	0.30	0.72
	029		493	0.07	2.40	0.17	0.21	0.56	0.71	0.30	0.64
	030		492	0.08	2.76	0.15	0.12	0.45	0.70	0.27	0.64
	031	FP	506	0.05	2.66	0.17	0.13	0.45	0.75	0.31	0.67
	032		524	0.06	2.79	0.16	0.10	0.38	0.62	0.24	0.61
	033		487	0.08	2.69	0.14	0.11	0.45	0.70	0.25	0.62
	034		492	0.06	3.13	0.21	0.14	0.42	0.66	0.23	0.66
	035		498	0.05	2.57	0.18	0.18	0.63	0.73	0.25	0.78
	036		511	0.06	2.93	0.16	0.15	0.50	0.66	0.27	0.72
		Mean		491	0.07	2.74	0.18	0.15	0.48	0.69	0.28
100	037		432	0.06	3.05	0.16	0.27	0.51	0.79	0.32	0.76
	038		446	0.05	3.14	0.12	0.15	0.54	0.68	0.23	0.71
	039		448	0.07	3.46	0.14	0.13	0.49	0.84	0.27	0.80
	040		485	0.07	3.35	0.14	0.13	0.62	0.72	0.29	0.76
	041		463	0.07	3.71	0.14	0.16	0.56	0.73	0.27	0.84
	042		429	0.08	2.93	0.14	0.18	0.63	0.73	0.30	0.70
	043		463	0.06	3.67	0.15	0.16	0.45	0.68	0.25	0.76
	044		502	0.05	3.33	0.18	0.10	0.46	0.59	0.19	0.70
	045	FP	481	0.04	3.17	0.18	0.14	0.57	0.69	0.27	0.83
	046		496	0.06	3.74	0.15	0.11	0.48	0.66	0.24	0.83
	047		465	0.05	3.68	0.15	0.13	0.58	0.70	0.22	0.76
048		502	0.07	3.16	0.13	0.13	0.51	0.67	0.23	0.68	
	Mean		468	0.06	3.37	0.15	0.15	0.53	0.71	0.26	0.76

FP : Failed to cause pregnancy.

Appendix 20-1

Individual absolute organ weights of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Thymus (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Kidney (g)
0	501		331	0.30	11.13	0.62	1.77
	502		285	0.29	10.70	0.61	1.75
	503		324	0.21	12.89	0.92	1.96
	504		307	0.22	9.35	0.60	1.84
	505		325	0.29	11.66	0.66	1.87
	506		333	0.20	10.06	0.84	2.31
	507		327	0.27	10.57	0.61	2.31
	508		318	0.22	11.00	0.68	1.67
	509		321	0.32	10.18	0.58	1.65
	510		335	0.31	11.48	0.64	1.90
	511		330	0.25	11.75	0.69	1.96
	512		337	0.32	11.68	0.82	2.06
	Mean		323	0.27	11.04	0.69	1.92
6	513		314	0.25	12.01	0.84	1.78
	514		307	0.19	11.90	0.75	1.67
	515	j	306	0.16	11.75	0.62	1.82
	516		192	0.12	4.98	0.36	1.31
	517		319	0.34	9.63	0.67	1.87
	518		300	0.23	10.16	0.71	1.68
	519		314	0.28	10.08	0.62	1.65
	520		342	0.38	11.75	0.71	1.83
	521		306	0.23	9.66	0.79	1.72
	522		344	0.34	12.31	0.72	1.84
	523		342	0.24	12.44	0.68	1.65
	524		305	0.19	10.26	0.63	1.85
	Mean		308	0.25	10.58	0.68	1.72

j : Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

Appendix 20-2

Individual absolute organ weights of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Thymus (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Kidney (g)
25	525		326	0.23	12.46	0.96	1.82
	526		279	0.13	10.99	0.63	1.94
	527		288	0.14	12.09	0.66	1.64
	528		275	0.23	9.65	0.62	1.84
	529		342	0.20	13.39	1.08	2.06
	530		306	0.20	10.77	0.59	1.80
	531	NP	(291)	(0.28)	(7.84)	(0.57)	(1.82)
	532		305	0.21	10.22	0.64	1.69
	533		330	0.24	12.51	0.73	1.79
	534		293	0.18	11.21	0.69	1.87
	535		327	0.22	11.41	0.66	2.00
	536		330	0.24	12.66	0.85	1.90
		Mean		309	0.20	11.58	0.74
100	537	KL	(257)	(0.10)	(10.25)	(0.54)	(1.83)
	538	KL	(250)	(0.12)	(11.09)	(0.43)	(1.79)
	539		280	0.23	12.11	0.48	1.71
	540		301	0.16	12.18	0.45	2.12
	541		275	0.11	11.40	0.60	1.69
	542		303	0.22	12.97	0.69	2.25
	543		291	0.19	11.81	0.62	2.02
	544		314	0.17	11.72	0.65	2.21
	545	NP	(315)	(0.34)	(11.39)	(0.45)	(1.81)
	546		265	0.11	10.42	0.51	1.84
547	KL	(302)	(0.23)	(10.90)	(0.56)	(1.89)	
548	KL	(265)	(0.13)	(12.31)	(0.49)	(2.17)	
	Mean		290	0.17	11.80	0.57	1.98

NP : Non-pregnant; KL : Killed because all pups died after delivery.

() : Not included in statistics.

Appendix 21-1 Individual relative organ weights of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Thymus (%)	Liver (%)	Spleen (%)	Kidney (%)
0	501		331	0.09	3.36	0.19	0.53
	502		285	0.10	3.75	0.21	0.61
	503		324	0.06	3.98	0.28	0.60
	504		307	0.07	3.05	0.20	0.60
	505		325	0.09	3.59	0.20	0.58
	506		333	0.06	3.02	0.25	0.69
	507		327	0.08	3.23	0.19	0.71
	508		318	0.07	3.46	0.21	0.53
	509		321	0.10	3.17	0.18	0.51
	510		335	0.09	3.43	0.19	0.57
	511		330	0.08	3.56	0.21	0.59
	512		337	0.09	3.47	0.24	0.61
	Mean		323	0.08	3.42	0.21	0.59
6	513		314	0.08	3.82	0.27	0.57
	514		307	0.06	3.88	0.24	0.54
	515	j	306	0.05	3.84	0.20	0.59
	516		192	0.06	2.59	0.19	0.68
	517		319	0.11	3.02	0.21	0.59
	518		300	0.08	3.39	0.24	0.56
	519		314	0.09	3.21	0.20	0.53
	520		342	0.11	3.44	0.21	0.54
	521		306	0.08	3.16	0.26	0.56
	522		344	0.10	3.58	0.21	0.53
	523		342	0.07	3.64	0.20	0.48
	524		305	0.06	3.36	0.21	0.61
	Mean		308	0.08	3.41	0.22	0.57

j : Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

Appendix 21-2

Individual relative organ weights of female rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Thymus (%)	Liver (%)	Spleen (%)	Kidney (%)
25	525		326	0.07	3.82	0.29	0.56
	526		279	0.05	3.94	0.23	0.70
	527		288	0.05	4.20	0.23	0.57
	528		275	0.08	3.51	0.23	0.67
	529		342	0.06	3.92	0.32	0.60
	530		306	0.07	3.52	0.19	0.59
	531	NP	(291)	(0.10)	(2.69)	(0.20)	(0.63)
	532		305	0.07	3.35	0.21	0.55
	533		330	0.07	3.79	0.22	0.54
	534		293	0.06	3.83	0.24	0.64
	535		327	0.07	3.49	0.20	0.61
	536		330	0.07	3.84	0.26	0.58
		Mean		309	0.07	3.75	0.24
100	537	KL	(257)	(0.04)	(3.99)	(0.21)	(0.71)
	538	KL	(250)	(0.05)	(4.44)	(0.17)	(0.72)
	539		280	0.08	4.33	0.17	0.61
	540		301	0.05	4.05	0.15	0.70
	541		275	0.04	4.15	0.22	0.61
	542		303	0.07	4.28	0.23	0.74
	543		291	0.07	4.06	0.21	0.69
	544		314	0.05	3.73	0.21	0.70
	545	NP	(315)	(0.11)	(3.62)	(0.14)	(0.57)
	546		265	0.04	3.93	0.19	0.69
	547	KL	(302)	(0.08)	(3.61)	(0.19)	(0.63)
548	KL	(265)	(0.05)	(4.65)	(0.18)	(0.82)	
	Mean		290	0.06	4.08	0.20	0.68

NP : Non-pregnant; KL : Killed because all pups died after delivery.

() : Not included in statistics.

Individual estrous cycle of rats before mating period treated orally with 1,3-dicyanobenzene
in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day of the inspection period															Mean estrous cycle# (day)	Group mean estrous cycle (day)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
0	501	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	4.1
	502	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	503	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	V	4.0	
	504	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	505	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	506	IV	V	V	V	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	507	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	508	III	IV	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.3	
	509	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	510	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	511	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	512	I	III	IV	V	I	III	IV	V	V	V	I	III	IV	V	I	5.0	(0/12) ^a
6	513	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	4.1
	514	IV	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.5	
	515	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	516	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	517	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	518	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	519	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	520	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	521	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	522	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	523	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	I	4.5	
	524	V	I	IV	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	(0/12) ^a

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metaestrus. V: Diestrus. # : Mean days from III to next III.

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

Individual estrous cycle of rats before mating period treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day of the inspection period															Mean estrous cycle# (day)	Group mean estrous cycle (day)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
25	525	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	4.0	
	526	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0		
	527	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0		
	528	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0		
	529	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0		
	530	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0		
	531	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0		
	532	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0		
	533	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0		
	534	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0		
	535	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0		
	536	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0		(0/12) ^a
100	537	IV	V	V	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	4.2	
	538	V	I	III	III	IV	V	I	III	III	IV	V	I	III	III	IV	5.0		
	539	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0		
	540	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0		
	541	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	4.3		
	542	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0		
	543	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0		
	544 ^b	IV	V	I	III	IV	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		(----
	545	V	I	III	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.5		
	546	IV	V	I	III	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.5		
	547	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0		
	548 ^b	III	IV	V	I	III	IV	V	V	V	V	V	V	V	V	V	(----		(2/12) ^b

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metaestrus. V: Diestrus. # : Mean days from III to next III.

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

() : Not included in statistics.

(0 mg/kg/day)

Female number	Paired male number	Mating period (day)																							
		1		2		3		4		5		6		7		8									
		Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle						
501	001	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+												
502	002	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+												
503	003	-	I	-	+	III	+																		
504	004	-	IV	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-
505	005	-	V	-	-	I	-	+	III	+															
506	006	+	III	+																					
507	007	-	V	-	+	III	+																		
508	008	-	V	-	-	I	-	+	III	+															
509	009	-	V	-	-	I	-	-	I	-	+	III	+												
510	010	-	I	-	+	III	+																		
511	011	-	V	-	-	I	-	+	III	+															
512	012	-	III	-	+	III	+																		

Female number	Paired male number	Mating period (day)																		Pairing days until copulation (days)	Group mean pairing days until copulation (days)						
		9		10		11		12		13		14															
		Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle														
501	001																								4		
502	002																									4	
503	003																									2	
504	004	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+							14	
505	005																									3	
506	006																									1	3.7
507	007																									2	
508	008																									3	
509	009																									4	
510	010																									2	
511	011																									3	
512	012																									2	

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metaestrus. V: Diestrus.

+ : Confirmed. - : Not confirmed.

(6 mg/kg/day)

Female number	Paired male number	Mating period (day)																							
		1		2		3		4		5		6		7		8									
		Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle						
513	013	+	III	+																					
514	014	-	V	-	-	I	-	+	III	+															
515	015	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-
516	016	-	V	-	-	I	-	+	III	+															
517	017	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+												
518	018	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+												
519	019	-	I	-	+	III	+																		
520	020	+	III	+																					
521	021	-	V	-	-	I	-	+	III	+															
522	022	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+												
523	023	+	III	+																					
524	024	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+												

Female number	Paired male number	Mating period (day)																		Pairing days until copulation (days)	Group mean pairing days until copulation (days)					
		9		10		11		12		13		14														
		Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle	Vaginal plug	Estrous cycle													
513	013																							1		
514	014																								3	
515	015	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-			
516	016																								3	
517	017																								4	
518	018																								4	2.7
519	019																								2	
520	020																								1	
521	021																								3	
522	022																								4	
523	023																								1	
524	024																								4	

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metaestrus. V: Diestrus.

+ : Confirmed. - : Not confirmed.

(25 mg/kg/day)

Female number	Paired male number	Mating period (day)																								
		1		2		3		4		5		6		7		8										
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	
525	025	-	V	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+													
526	026	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+													
527	027	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+													
528	028	+	III	+																						
529	029	-	V	-	-	I	-	+	III	+																
530	030	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+													
531	031	+	IV	+																						
532	032	+	III	+																						
533	033	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+													
534	034	-	I	-	+	III	+																			
535	035	+	III	+																						
536	036	-	V	-	-	I	-	+	III	+																

Female number	Paired male number	Mating period (day)																		Pairing days until copulation (days)	Group mean pairing days until copulation (days)							
		9		10		11		12		13		14																
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm									
525	025																									4		
526	026																										4	
527	027																										4	
528	028																										1	
529	029																										3	
530	030																										4	
531	031																										1	
532	032																										1	
533	033																										4	
534	034																										2	
535	035																										1	
536	036																										3	

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metaestrus. V: Diestrus.

+ : Confirmed. - : Not confirmed.

(100 mg/kg/day)

Female number	Paired male number	Mating period (day)																							
		1		2		3		4		5		6		7		8									
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm
537	037	+	III	+																					
538	038	-	V	-	-	I	-	-	III	-	+	III	+												
539	039	-	I	-	+	III	+																		
540	040	-	V	-	-	I	-	+	III	+															
541	041	-	V	-	-	I	-	+	III	+															
542	042	-	V	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+												
543	043	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+												
544	044	-	I	-	+	III	+																		
545	045	+	III	+																					
546	046	-	I	-	+	III	+																		
547	047	-	V	-	+	III	+																		
548	048	+	III	+																					

Female number	Paired male number	Mating period (day)																		Pairing days until copulation (days)	Group mean pairing days until copulation (days)					
		9		10		11		12		13		14														
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm							
537	037																								1	
538	038																									4
539	039																									2
540	040																									3
541	041																									3
542	042																									4
543	043																									4
544	044																									2
545	045																									1
546	046																									2
547	047																									2
548	048																									1

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metaestrus. V: Diestrus.

+ : Confirmed. - : Not confirmed.

Appendix 24-1 Individual reproduction results of rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 0 mg/kg/day >

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
501	001	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	15	14	93.3
502	002	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	15	14	93.3
503	003	'10.10.1	2	+	+	'10.10.23	22	TK	21	21	100.0
504	004	'10.10.13	14	+	+	'10.11.5	23	TK	13	8	61.5
505	005	'10.10.2	3	+	+	'10.10.24	22	TK	16	16	100.0
506	006	'10.9.30	1	+	+	'10.10.22	22	TK	16	16	100.0
507	007	'10.10.1	2	+	+	'10.10.23	22	TK	16	16	100.0
508	008	'10.10.2	3	+	+	'10.10.25	23	TK	18	14	77.8
509	009	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	13	12	92.3
510	010	'10.10.1	2	+	+	'10.10.23	22	TK	17	17	100.0
511	011	'10.10.2	3	+	+	'10.10.24	22	TK	16	16	100.0
512	012	'10.10.1	2	+	+	'10.10.23	22	TK	19	19	100.0
		Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	
		12/12 (100)	12 3.7 3.4	12/12 (100)	12/12 (100)	22.4 0.5	16.3 2.3	15.3 3.3	93.2 11.9		

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

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

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

Implantation index = (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) ×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

a : Confirmed. b : Not confirmed.

Appendix 24-2 Individual reproduction results of rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 6 mg/kg/day >

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
513	013	'10.9.30	1	+	+	'10.10.22	22	TK	14	13	92.9
514	014	'10.10.2	3	+	+	'10.10.25	23	TK	13	13	100.0
515	# 015	-		(+)	(+)	(10.11.4)		(TK)	(15)	(15)	(100.0)
516	016	'10.10.2	3	+	+	'10.10.25	23	TK	14	13	92.9
517	017	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	14	5	35.7
518	018	'10.10.3	4	+	+	'10.10.25	22	TK	16	16	100.0
519	019	'10.10.1	2	+	+	'10.10.24	23	TK	14	13	92.9
520	020	'10.9.30	1	+	+	'10.10.22	22	TK	17	17	100.0
521	021	'10.10.2	3	+	+	'10.10.25	23	TK	15	15	100.0
522	022	'10.10.3	4	+	+	'10.10.25	22	TK	18	18	100.0
523	023	'10.9.30	1	+	+	'10.10.22	22	TK	19	18	94.7
524	024	'10.10.3	4	+	+	'10.10.25	22	TK	17	17	100.0
		Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	
			11			11					
		11/12 (91.7)	2.7 1.3	11/11 (100)	11/11 (100)	22.5 0.5		15.5 2.0	14.4 3.7	91.7 18.9	

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

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

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

Implantation index = (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) ×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition.

a : Confirmed. b : Not confirmed.

: Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

() : Not included in statistics.

Appendix 24-3 Individual reproduction results of rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 25 mg/kg/day >

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
525	025	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	19	16	84.2
526	026	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	18	16	88.9
527	027	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	20	17	85.0
528	028	'10.9.30	1	+	+	'10.10.22	22	TK	14	14	100.0
529	029	'10.10.2	3	+	+	'10.10.24	22	TK	18	18	100.0
530	030	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	17	15	88.2
531	NP 031	'10.9.30	1	-	-	-	-	-	-	-	-
532	032	'10.9.30	1	+	+	'10.10.22	22	TK	16	16	100.0
533	033	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	19	16	84.2
534	034	'10.10.1	2	+	+	'10.10.24	23	TK	18	18	100.0
535	035	'10.9.30	1	+	+	'10.10.23	23	TK	16	16	100.0
536	036	'10.10.2	3	+	+	'10.10.24	22	TK	17	17	100.0
		Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	
			12			11		11	11	11	
		12/12 (100)	2.7 1.4	11/12 (91.7)	11/11 (100)	22.6 0.5		17.5 1.7	16.3 1.2	93.7 7.4	

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

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

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

Implantation index = (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) × 100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition.

a : Confirmed. b : Not confirmed.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Appendix 24-4 Individual reproduction results of rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

< 100 mg/kg/day >

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
537	KL 037	'10.9.30	1	+	+	'10.10.23	23	—	14	14	100.0
538	KL 038	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	—	14	14	100.0
539	039	'10.10.1	2	+	+	'10.10.23	22	TK	17	15	88.2
540	040	'10.10.2	3	+	+	'10.10.24	22	TK	14	14	100.0
541	041	'10.10.2	3	+	+	'10.10.25	23	TK	15	15	100.0
542	042	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	18	16	88.9
543	043	'10.10.3	4	+	+	'10.10.26	23	TK	20	17	85.0
544	044	'10.10.1	2	+	+	'10.10.24	23	TK	17	16	94.1
545	NP 045	'10.9.30	1	—	—	—	—	—	—	—	—
546	046	'10.10.1	2	+	+	'10.10.24	23	TK	16	16	100.0
547	KL 047	'10.10.1	2	+	+	'10.10.24	23	—	12	2	16.7
548	KL 048	'10.9.30	1	+	+	'10.10.23	23	—	19	19	100.0
		Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	
		12/12 (100)	12 2.4 1.2	11/12 (91.7)	11/11 (100)	11 22.8 0.4	11 16.0 2.4	11 14.4 4.4	11 88.4 24.5		

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

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

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

Implantation index = (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) ×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition.

a : Confirmed. b : Not confirmed.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

KL : Killed because all pups died after delivery.

Appendix 25-1 Individual litter results of rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

[0 mg/kg/day]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation							Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
				Live pups			Dead pups					T	M	F		On day 0		On day 4	
				T	M	F	T	M	F	SI						M	F	M	F
501	14	14	100.0	14	8	6	0	0	0	0	100.0	14	8	6	100.0	7.9	7.3	13.2	12.1
502	14	14	100.0	14	2	12	0	0	0	0	100.0	14	2	12	100.0	7.7	7.3	11.7	11.2
503	21	20	95.2	20	14	6	0	0	0	0	100.0	18	13	5	90.0	6.2	5.8	9.6	9.1
504	8	7	87.5	7	2	5	0	0	0	0	100.0	7	2	5	100.0	6.5	8.1	8.1	14.8
505	16	15	93.8	15	7	8	0	0	0	0	100.0	14	6	8	93.3	6.0	6.4	10.3	10.5
506	16	16	100.0	16	6	10	0	0	0	0	100.0	16	6	10	100.0	7.9	7.3	10.7	10.5
507	16	16	100.0	16	7	9	0	0	0	0	100.0	16	7	9	100.0	6.3	6.0	9.8	9.2
508	14	14	100.0	14	6	8	0	0	0	0	100.0	14	6	8	100.0	7.7	7.5	12.5	11.8
509	12	10	83.3	10	3	7	0	0	0	0	100.0	10	3	7	100.0	8.2	7.3	13.5	12.8
510	17	17	100.0	17	8	9	0	0	0	0	100.0	17	8	9	100.0	6.6	6.2	8.7	9.4
511	16	15	93.8	14	9	5	1	1	0	0	93.3	13	9	4	92.9	6.9	6.4	11.1	10.5
512	19	18	94.7	17	9	8	1	1	0	0	94.4	16	9	7	94.1	6.4	6.3	10.7	11.0
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	15.3	14.7	95.7	14.5	6.8	7.8	0.2	0.2	0.0	0.0	99.0	14.1	6.6	7.5	97.5	7.0	6.8	10.8	11.1
S.D.	3.3	3.4	5.6	3.4	3.4	2.1	0.4	0.4	0.0	0.0	2.4	3.1	3.2	2.3	3.8	0.8	0.7	1.7	1.6

Sex ratio : 0.89 (Total number of male pups on day 0 of lactation/Total number of female pups on day 0 of lactation=83/93).

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

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

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

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

Appendix 25-2 Individual litter results of rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

[6 mg/kg/day]

Perental female number	No. of implan- born sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation							Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
				Live pups			Dead pups					T	M	F		On day 0		On day 4	
				T	M	F	T	M	F	SI						M	F	M	F
513	13	13	100.0	12	8	4	1	1	0	0	92.3	12	8	4	100.0	7.2	6.7	12.9	12.1
514	13	13	100.0	13	9	4	0	0	0	0	100.0	13	9	4	100.0	7.5	7.5	12.1	12.0
515	# (15)	(14)	(93.3)	(14)	(11)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100.0)	(14)	(11)	(3)	(100.0)	(7.0)	(6.7)	(11.6)	(11.6)
516	13	13	100.0	13	7	6	0	0	0	0	100.0	3	2	1	23.1	5.4	4.3	3.5	3.2
517	5	5	100.0	5	3	2	0	0	0	0	100.0	5	3	2	100.0	8.1	7.8	12.9	14.0
518	16	16	100.0	16	9	7	0	0	0	0	100.0	16	9	7	100.0	6.5	6.0	9.1	9.0
519	13	13	100.0	13	6	7	0	0	0	0	100.0	13	6	7	100.0	7.7	7.4	12.6	12.7
520	17	14	82.4	14	6	8	0	0	0	0	100.0	14	6	8	100.0	7.1	6.9	11.3	10.7
521	15	14	93.3	14	7	7	0	0	0	0	100.0	14	7	7	100.0	7.2	6.8	11.4	10.9
522	18	18	100.0	18	7	11	0	0	0	0	100.0	18	7	11	100.0	6.2	6.0	9.7	9.4
523	18	18	100.0	18	11	7	0	0	0	0	100.0	18	11	7	100.0	6.3	7.0	10.3	9.8
524	17	17	100.0	17	13	4	0	0	0	0	100.0	17	13	4	100.0	6.4	5.6	10.0	8.4
No.	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Mean	14.4	14.0	97.8	13.9	7.8	6.1	0.1	0.1	0.0	0.0	99.3	13.0	7.4	5.6	93.0	6.9	6.5	10.5	10.2
S.D.	3.7	3.6	5.5	3.6	2.7	2.5	0.3	0.3	0.0	0.0	2.3	4.9	3.2	2.9	23.2	0.8	1.0	2.7	2.9

Sex ratio : 1.30 (Total number of male pups on day 0 of lactation/Total number of female pups on day 0 of lactation=87/67).

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

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

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

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

: Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

() : Not included in statistics.

Appendix 25-3 Individual litter results of rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

[25 mg/kg/day]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation							Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
				Live pups			Dead pups					T	M	F		On day 0		On day 4	
				T	M	F	T	M	F	SI						M	F	M	F
525	16	14	87.5	14	4	10	0	0	0	0	100.0	14	4	10	100.0	7.5	7.3	12.6	12.0
526	16	13	81.3	13	6	7	0	0	0	0	100.0	13	6	7	100.0	7.3	6.9	11.1	10.6
527	17	17	100.0	17	8	9	0	0	0	0	100.0	17	8	9	100.0	6.4	6.2	10.5	10.1
528	14	14	100.0	14	5	9	0	0	0	0	100.0	14	5	9	100.0	6.6	6.4	9.8	10.0
529	18	18	100.0	18	9	9	0	0	0	0	100.0	15	8	7	83.3	6.2	5.8	10.0	9.6
530	15	15	100.0	15	8	7	0	0	0	0	100.0	15	8	7	100.0	5.8	5.9	9.7	9.9
531	NP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
532	16	16	100.0	16	7	9	0	0	0	0	100.0	16	7	9	100.0	6.3	5.8	9.3	8.7
533	16	15	93.8	14	5	9	1	1	0	0	93.3	14	5	9	100.0	7.3	7.0	12.0	11.9
534	18	14	77.8	13	7	6	1	1	0	0	92.9	10	6	4	76.9	6.6	6.3	9.4	9.7
535	16	12	75.0	10	4	6	2	1	1	0	83.3	10	4	6	100.0	7.4	7.0	14.1	13.5
536	17	17	100.0	16	10	6	1	1	0	0	94.1	16	10	6	100.0	6.8	6.3	10.5	10.1
No.	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Mean	16.3	15.0	92.3	14.5	6.6	7.9	0.5	0.4	0.1	0.0	96.7	14.0	6.5	7.5	96.4	6.7	6.4	10.8	10.6
S.D.	1.2	1.8	10.1	2.2	2.0	1.5	0.7	0.5	0.3	0.0	5.4	2.3	1.9	1.8	8.2	0.6	0.5	1.5	1.4

Sex ratio : 0.88 (Total number of male pups on day 0 of lactation/Total number of female pups on day 0 of lactation=77/88).

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

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

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

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

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Appendix 25-4 Individual litter results of rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

[100 mg/kg/day]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation								Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
				Live pups				Dead pups					T	M	F		On day 0		On day 4	
				T	M	F	SI	T	M	F	M						F	M	F	
537	KL	14	100.0	1	0	1	13	8	5	0	7.1	0	0	0	0	—	5.1	—	—	
538	KL	14	85.7	9	7	2	3	1	2	0	75.0	0	0	0	0	—	6.5	—	—	
539		15	100.0	14	5	9	1	0	1	0	93.3	13	5	8	92.9	5.4	4.9	9.1	7.5	
540		14	100.0	13	7	6	1	1	0	0	92.9	6	3	3	46.2	6.0	5.3	8.9	8.8	
541		15	100.0	12	4	8	3	1	2	0	80.0	6	3	3	50.0	6.4	5.8	7.1	7.0	
542		16	87.5	7	3	4	7	2	5	0	50.0	5	3	2	71.4	5.9	6.0	9.3	9.2	
543		17	82.4	12	6	6	2	1	1	0	85.7	2	1	1	16.7	6.2	5.8	6.4	6.4	
544		16	75.0	6	4	2	6	4	2	0	50.0	1	1	0	16.7	6.1	5.2	5.9	—	
545	NP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
546		16	81.3	7	3	4	6	4	2	0	53.8	1	1	0	14.3	5.9	5.4	6.0	—	
547	KL	2	100.0	1	0	1	1	0	1	0	50.0	0	0	0	0	—	7.8	—	—	
548	KL	19	63.2	2	0	2	10	6	4	0	16.7	0	0	0	0	—	5.1	—	—	
No.		11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	7	11	7	5	
Mean		14.4	12.5	88.6	7.6	3.5	4.1	4.8	2.5	2.3	0.0	59.5	3.1	1.5	1.5	28.0	6.0	5.7	7.5	7.8
S.D.		4.4	3.6	12.6	4.8	2.7	2.8	4.0	2.6	1.7	0.0	29.1	4.1	1.7	2.5	32.4	0.3	0.8	1.5	1.2

Sex ratio : 0.96 (Total number of male pups on day 0 of lactation/Total number of female pups on day 0 of lactation=67/70).

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

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

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

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

KL : Killed because all pups died after delivery.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Appendix 26-1 Individual external findings of pups from pregnant rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

[0 mg/kg/day]

Parental female number	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	14	14	20	7	15	16	16	14	10	17	15	18	176	12	--	--
No. of pups examined																
Total	14	14	20	7	15	16	16	14	10	17	15	18	176	12	--	--
Live	14	14	20	7	15	16	16	14	10	17	14	17	174	--	--	--
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	--	--	--
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	--	--	--
(%)	(0)	(0)	(0)	(14.3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	--	12	(1.2)	(4.1)
Live	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	--	--	--
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--	--	--
External malformations																
Dwarf Total	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	--	--	--
(%)	(0)	(0)	(0)	(14.3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	--	12	(1.2)	(4.1)
Live	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	--	--	--
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--	--	--

Appendix 26-2 Individual external findings of pups from pregnant rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

[6 mg/kg/day]

Parental female number	513	514	515 #	516	517	518	519	520	521	522	523	524	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	13	13	[14]	13	5	16	13	14	14	18	18	17	154	11	—	—
No. of pups examined																
Total	13	13	[14]	13	5	16	13	14	14	18	18	17	154	11	—	—
Live	12	13	[14]	13	5	16	13	14	14	18	18	17	153	—	—	—
Dead	1	0	[0]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	[0]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(0)	(0)	[0]	(7.7)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	11	(0.7)	(2.3)
Live	0	0	[0]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	[0]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
External malformations																
Dwarf Total	0	0	[0]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(0)	(0)	[0]	(7.7)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	11	(0.7)	(2.3)
Live	0	0	[0]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	[0]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

: Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

[] : Not included in statistics.

Appendix 26-3 Individual external findings of pups from pregnant rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

[25 mg/kg/day]

Parental female number	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	14	13	17	14	18	15	NP	16	15	14	12	17	165	11	—	—
No. of pups examined																
Total	14	13	17	14	18	15	—	16	15	14	12	17	165	11	—	—
Live	14	13	17	14	18	15	—	16	14	13	10	16	160	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	1	1	2	1	5	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	11	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Appendix 26-4 Individual external findings of pups from pregnant rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/developmental toxicity screening test

[100 mg/kg/day]

Parental female number	537 ^{KL}	538 ^{KL}	539	540	541	542	543	544	545	546	547 ^{KL}	548 ^{KL}	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	14	12	15	14	15	14	14	12	NP	13	2	12	137	11	—	—
No. of pups examined																
Total	14	12	15	14	15	14	14	12	—	13	2	12	137	11	—	—
Live	1	9	14	13	12	7	12	6	—	7	1	2	84	—	—	—
Dead	13	3	1	1	3	7	2	6	—	6	1	10	53	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(0)	(0)	(0)	—	11	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	—	—

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

KL : Killed because all pups died after delivery.

Appendix 27-1 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/development toxicity screening test

[0 mg/kg/day]

Parental female number	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	14	14	20	7	15	16	16	14	10	17	15	18	176	12	—	—
No. of pups examined																
Total	14	14	20	7	15	16	16	14	10	17	15	18	176	12	—	—
Live	14	14	20	7	15	16	16	14	10	17	14	17	174	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.0)	(0.0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.0)	(0.0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

Appendix 27-2 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/development toxicity screening test

[6 mg/kg/day]

Parental female number	513	514	515 #	516	517	518	519	520	521	522	523	524	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	13	13	[14]	13	5	16	13	14	14	18	18	17	154	11	—	—
No. of pups examined																
Total	13	13	[14]	13	5	16	13	14	14	18	18	17	154	11	—	—
Live	12	13	[14]	13	5	16	13	14	14	18	18	17	153	—	—	—
Dead	1	0	[0]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	[0]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	[0]	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	11	(0.0)	(0.0)
Live	0	0	[0]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	[0]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	0	1	[0]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	—	—	—
(%)	(0)	(7.7)	[0]	(0)	(0)	(6.3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	11	(1.3)	(2.8)
Live	0	1	[0]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	—	—	—
Dead	0	0	[0]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Persistent left umbilical artery																
Total	0	1	[0]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	—	—	—
(%)	(0)	(7.7)	[0]	(0)	(0)	(6.3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	11	(1.3)	(2.8)
Live	0	1	[0]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	—	—	—
Dead	0	0	[0]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

: Could not confirmed copulation, but confirmed parturition.

[] : Not included in statistics.

Appendix 27-3 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/development toxicity screening test

[25 mg/kg/day]

Parental female number	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	14	13	17	14	18	15	NP	16	15	14	12	17	165	11	—	—
No. of pups examined																
Total	14	13	17	14	18	15	—	16	15	14	12	17	165	11	—	—
Live	14	13	17	14	18	15	—	16	14	13	10	16	160	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	1	1	2	1	5	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	11	(0.0)	(0.0)
Live	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	0	0	0	0	0	0	—	1	1	0	0	0	2	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(6.3)	(6.7)	(0)	(0)	(0)	—	11	(1.2)	(2.6)
Live	0	0	0	0	0	0	—	1	1	0	0	0	2	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Persistent left umbilical artery																
Total	0	0	0	0	0	0	—	1	1	0	0	0	2	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(6.3)	(6.7)	(0)	(0)	(0)	—	11	(1.2)	(2.6)
Live	0	0	0	0	0	0	—	1	1	0	0	0	2	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Appendix 27-4 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with 1,3-dicyanobenzene in the reproduction/development toxicity screening test

[100 mg/kg/day]

Parental female number	537 ^{KL}	538 ^{KL}	539	540	541	542	543	544	545	546	547 ^{KL}	548 ^{KL}	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	14	12	15	14	15	14	14	12	NP	13	2	12	137	11	—	—
No. of pups examined																
Total	14	12	15	14	15	14	14	12	—	13	2	12	137	11	—	—
Live	1	9	14	13	12	7	12	6	—	7	1	2	84	—	—	—
Dead	13	3	1	1	3	7	2	6	—	6	1	10	53	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(0)	(0)	(0)	—	11	(0.0)	(0.0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	0	2	0	0	0	0	2	0	—	0	0	0	4	—	—	—
(%)	(0)	(16.7)	(0)	(0)	(0)	(0)	(14.3)	(0)	—	(0)	(0)	(0)	—	11	(2.8)	(6.3)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	2	0	0	0	0	2	0	—	0	0	0	4	—	—	—
Dilatation of renal pelvis																
Total	0	2	0	0	0	0	2	0	—	0	0	0	4	—	—	—
(%)	(0)	(16.7)	(0)	(0)	(0)	(0)	(14.3)	(0)	—	(0)	(0)	(0)	—	11	(2.8)	(6.3)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	2	0	0	0	0	2	0	—	0	0	0	4	—	—	—

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

KL : Killed because all pups died after delivery.

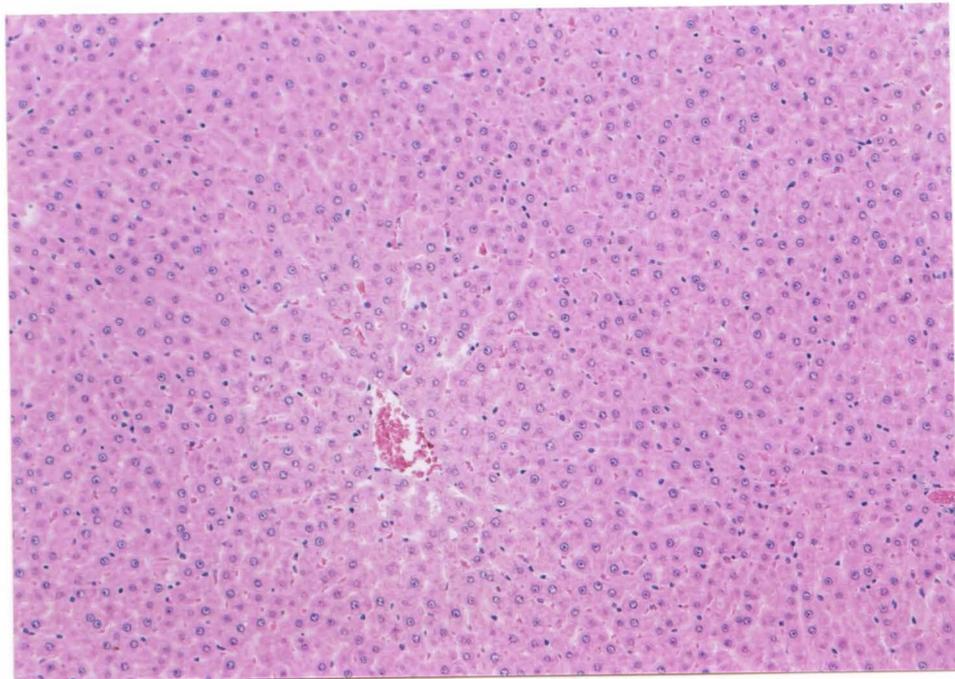


Photo 1. Liver (0 mg/kg group, male, No. 003, H-E stain, $\times 132$)
No abnormalities

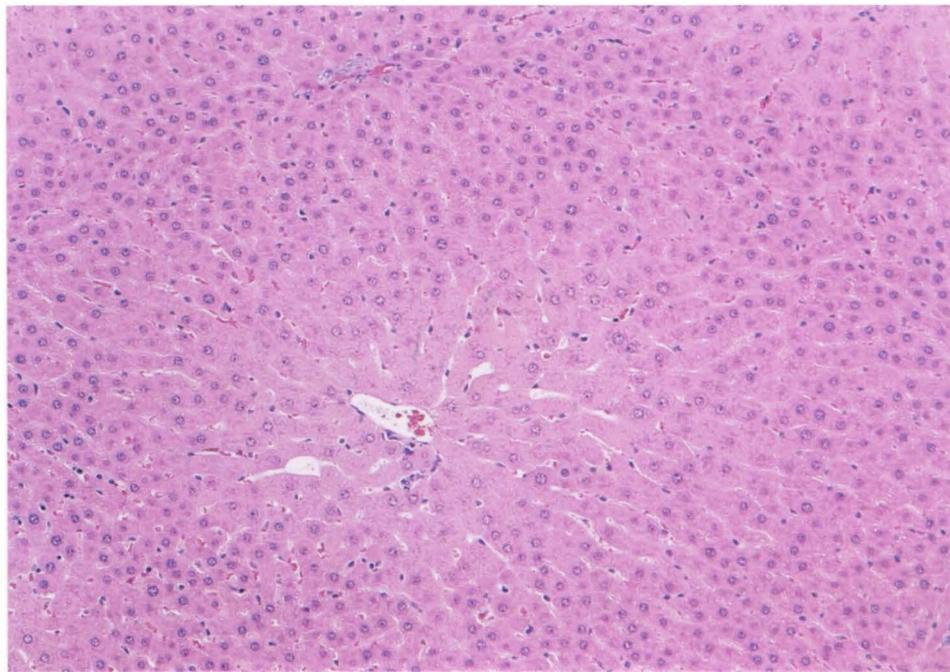


Photo 2. Liver (100 mg/kg group, male, No. 046, H-E stain, $\times 132$)
Centrilobular hypertrophy of the hepatocyte

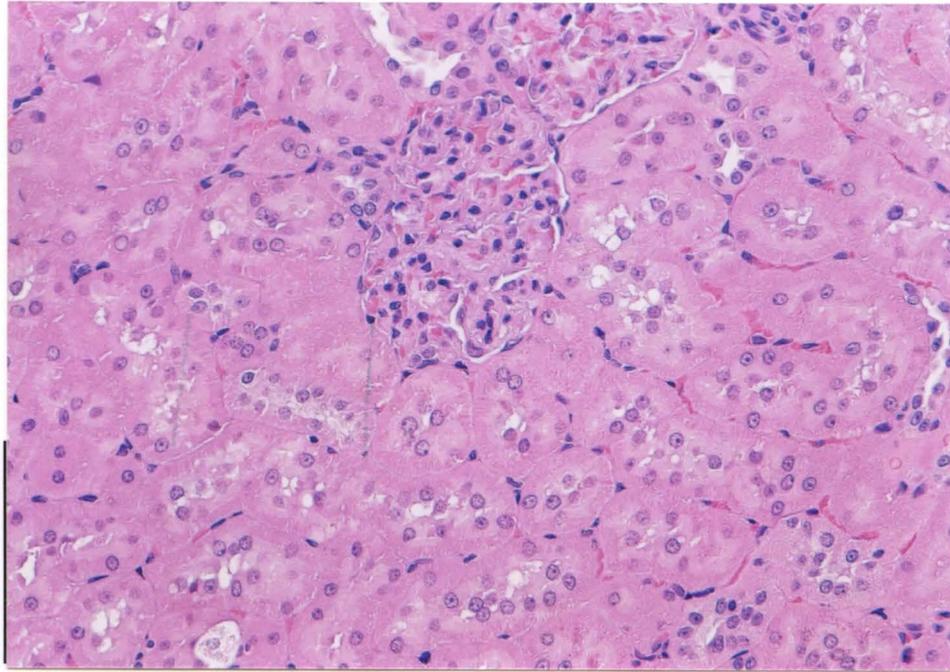


Photo 3. Kidney (0 mg/kg group, male, No. 003, H-E stain, $\times 264$)
Hyaline droplets of proximal tubular epithelium (slight)

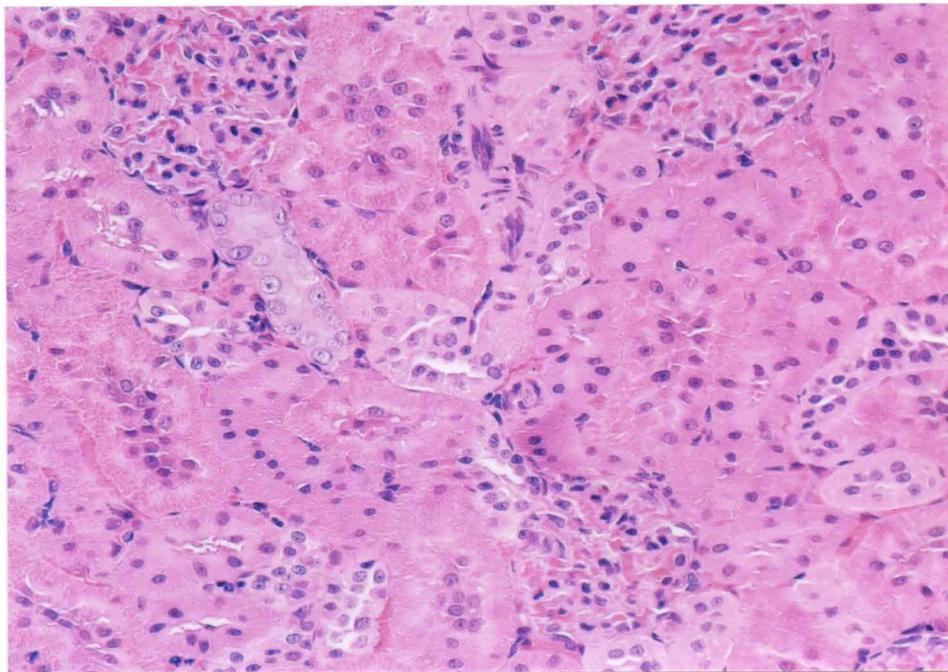


Photo 4. Kidney (100 mg/kg group, male, No. 044, H-E stain, $\times 264$)
Hyaline droplets of proximal tubular epithelium (severe) and
basophilic tubules

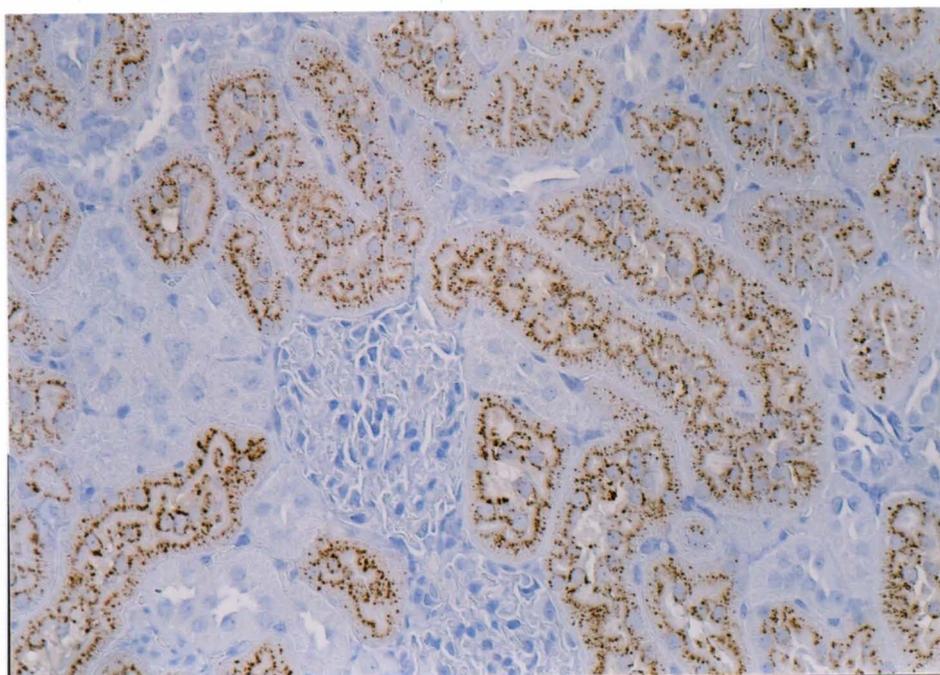


Photo 5. Kidney (0 mg/kg group, male, No. 003, α -2u-globulin immno-stain, $\times 264$) Positive

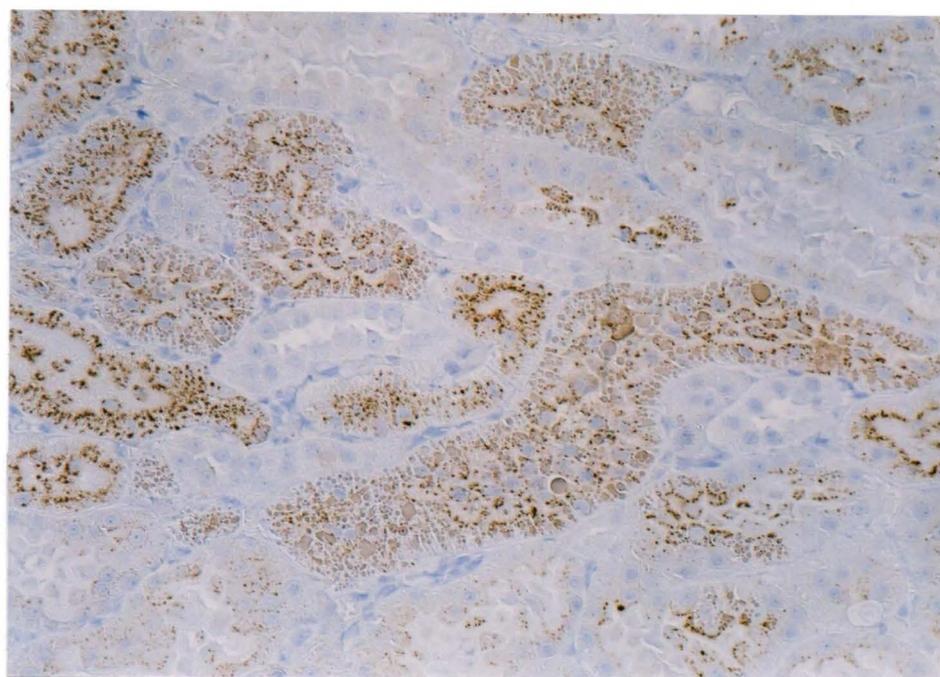


Photo 6. Kidney (100 mg/kg group, male, No. 044, α -2u-globulin immno-stain, $\times 264$) Positive