2007 年 1 月 31 日

トリチオシアヌル酸のラットを用いる
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課
化学物質安全対策室　委託

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所

目次

要約 ---------- 1
試験目的 ---------- 2

材料と方法 ---------- 2
1. 被験物質 ---------- 2
2. 使用動物および飼育方法 ---------- 3
3. 投与検体の調製 ---------- 4
4. 投与量の設定および投与方法 ---------- 5
5. 観察と検査 ---------- 5
6. データ解析法 ---------- 10

試験成績 ---------- 11
1. 反復投与毒性および回復性試験 ---------- 11
2. 生殖発生毒性 ---------- 18
考察 ---------- 19
参考文献 ---------- 21

Figures 1～6
Tables 1～35

要約

トリチオシアヌル酸の、雌雄動物に対する反復投与による影響とその回復性、親動物の生殖・発生および新生児の発育に及ぼす影響を検討するために、0(溶媒対照)、62.5、125 および 250 mg/kg の用量で雌雄の Sprague-Dawley 系ラット(各 12 匹／群)に反復経口投与した。投与 15 日目から 2 週間を限度として交配させ、雄は 42 日間投与した後に剖検した。雌は交配後、自然分娩させて母動物は哺育 5 日に、出生児は哺育 4 日に剖検した。また、0 および 250 mg/kg 投与群の各雄 5 匹および雌のサテライト群(0 および 250 mg/kg)は 42 日間投与した後、14 日間休薬させて剖検した。その結果を以下に要約した。

1. 反復投与毒性および回復性試験

250 mg/kg 投与群において雌雄各 1 例の死亡が認められた。250 mg/kg 投与群の雌雄には、耳介黒色斑、尾先端暗紫色、尾結節、耳介結節、陰嚢硬化、陰嚢結節などが観察され、休薬中も継続してみられた。125 mg/kg 投与群の雄、250 mg/kg 投与群の雌雄では、投与後に一過性の流涎が認められた。詳細な症状観察では、神経毒性を示唆する変化は認められなかった。体重推移については、250 mg/kg 投与群の雄で顕著な体重増加抑制および摂餌量の低下が認められ、同様の変化は、同群雌のサテライト群でもみられたが、休薬に伴いその変化は消失した。

250 mg/kg 投与群の雄では、尿沈渣中に赤血球が高頻度に認められ、血液学検査ではヘマトクリット値が、血液生化学検査では血中アルブミン濃度が有意に低下した。耳介、尾および陰嚢にみられた病変部の病理組織学検査では、いずれも皮下織に多核巨細胞を伴う肉芽腫と炎症性細胞浸潤が観察された。腎臓の組織学検査では、乳頭部の壊死あるいは浮腫が、雄の 62.5 mg/kg 以上の投与群および雌の 250 mg/kg 投与群で認められ、近位尿細管の褐色色素沈着が雌雄とも 62.5 mg/kg 以上の投与群で認められた。副腎の組織学検査では、皮質索状帯細胞のびまん性肥大が、62.5 mg/kg 以上の投与群で認められた。上記の腎臓および副腎の変化は、休薬後の動物にも認められた。

2. 生殖発生毒性

250 mg/kg 投与群で不妊が 3 例認められ、同群の黄体数が対照群より有意に減少した。性周期、交尾率、出産率、妊娠期間、分娩率には被験物質投与の影響は認められなかった。出生児については、生存、性比および体重に被験物質投与の影響は認められず、形態異常も観察されなかった。

3. 無作用量

以上の結果より、本試験条件下でのトリチオシアヌル酸の反復投与毒性に関する無作用量は、62.5 mg/kg 以上の投与群で腎臓の近位尿細管に色素沈着、副腎皮質にびまん性肥大が認められたことから、雌雄とも 62.5 mg/kg/day 未満、生殖発生毒性に関する無作用量は、250 mg/kg 投与群に不妊が認められたことから 125 mg/kg/day と判断された。

試験目的

トリチオシアヌル酸は含ハロゲンポリマーの架橋剤および含ハロゲンポリマーとジエン系ゴムとの共架橋剤であり、工業用ゴム全般、ゴム-金属間の接着、金属の防錆剤として用いられている。

今回、OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、トリチオシアヌル酸の安全性確認の資料を得るために、ラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、親動物に対する反復投与の影響およびその回復性、ならびに新生児の生存性、発育および形態を含む生殖発生に及ぼす影響について検討したので報告する。

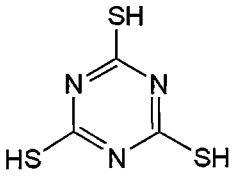
材料と方法

1. 被験物質

被験物質として用いたトリチオシアヌル酸(TTC)の性状は、以下の通りである。

化学名	トリチオシアヌル酸
略称	TTC
英　名	1,3,5-Triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
CAS No.	638-16-4
分子式	$C_3H_3N_3S_3$
分子量	177.27
物理化学的性質	性状　：淡黄色粉末
	融点　：300℃以上
	溶解性　：水に難溶、メタノール、アセトン、ジオキサンに微溶、セロソルブ、THF に可溶

構造式



本試験には、　　から提供された TTC 〔　　含量 99.8%(HPLC)、不純物 イオウ分 0.13%、Appendix A〕を用いた。被験物質は受領後(被験物質受領日:2005 年 1 月 24 日)使用時まで、被験物質受領保管庫において室温保管した。また、本試験の投与終了後に残余被験物質を被験物質入手先に送付し、提供元にて再度品質試験が非 GLP 下で実施され、試験前後で品質に変化が認められなかったことから、被験物質は試験期間中、安定であったと判断した(Appendix B)。

2. 使用動物および飼育方法

8 週齢の Sprague-Dawley(SD)系[Crl:CD(SD)、SPF] の雌雄ラットを、日本チャールス・リバー厚木飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて入荷日を含めて 14 日間予備飼育した。検疫・馴化期間中、毎日一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。また、雌全例の性周期を入荷翌日から毎日観察したほか、検疫終了日に雌雄全例の詳細な症状観察を実施した。その結果、検疫・馴化期間中、前肢の脱毛が雄 3 例、雌 2 例に認められた。また、4 日間隔以外の性周期を示した動物が 15 例で認められ、詳細な症状観察ではハンドリング時に過剰な警戒性を示した動物が雄 1 例、瞳孔径拡大が雄 1 例、皮膚潮紅が雄 1 例に認められた。群分けは以上の動物全てを除いたほか、検疫終了時(投与開始 1 日前)の測定体重をもとに体重の上位および下位を除いた動物を体重別層化無作為抽出法により群分けした。投与時の週齢は雌雄とも 10 週齢であった。なお、群分けによって試験系から除外された動物(雄 9 例、雌 35 例)のうち、雌 30 例は別試験(試験番号 Z-04-407-4)に移管し、雄 4 例、雌 5 例は殺処分、雄 5 例は微生物モニタリングに供した。入荷動物の入荷時および投与開始時の体重範囲は以下の通りである。

動物入荷日:	2005 年 5 月 11 日
入荷匹数:	雄 57 匹、雌 93 匹
入荷時体重:	雄 265.2～285.7 g (平均 275.9 g)、雌 165.2～189.3 g (平均 175.4 g)
投与開始日:	2005 年 5 月 26 日
投与時体重:	雄 355.5～405.2 g (平均 382.3 g)、雌 208.7～255.0 g (平均 232.1 g)

個体識別は、各動物の尾にフェルトペンで入荷動物番号を付し、検疫・馴化期間中は各飼育ケージに試験番号および入荷動物番号を記入した動物カードを掛け、群分け後は群ごとに色の異なる動物カードに試験番号、動物番号および入荷動物番号を記入した動物カードを掛けた。なお、出生児の個体識別は実施しなかった。

動物は、金属製金網床ケージ(220 w×270 d×190 h mm)に1匹ずつ(交配時は2匹／ケージ)収容し、許容温度21.0～25.0℃、許容湿度40.0～75.0%、換気回数約15回／時間、照明12時間(7時～19時点灯)に制御された飼育室(6号室)で、固型飼料(CE-2、日本クレア)および水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。妊娠18日(膣栓あるいは精子確認日＝妊娠0日)以降の母動物は、ラット用プラスチック製繁殖ケージ(350 w×400 d×180 h mm)に収容し、哺育4日(分娩日＝哺育0日)まで紙パルプ製チップ(ペパークリーン、日本エスエルシー)を床敷として供給して飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ22.5～26.0℃、50.0～65.0%であった。また、供給した飼料、水および床敷には試験に支障を来す可能性のある混入物は認められなかった。

3. 投与検体の調製

被験物質を秤量し、乳鉢で摩砕後、媒体を少量ずつ加え、5 w/v%に調製した。これを媒体で段階希釈して2.5および1.25 w/v%溶液を調製した。被験物質が水に難溶で、予備試験において均一に懸濁することが確認されたため、媒体は0.5 %カルボキシメチルセルロース・ナトリウム[日局カルメロースナトリウム(丸石製薬、ロット番号 4720)を日局注射用水(光製薬、ロット番号 A4ZCT1)で溶解]を選択した。投与検体は遮光下、冷蔵(3～8℃)で保管した。投与量と被験物質濃度は以下の通りである。

投与量(mg/kg)	濃度(w/v%)
62.5	1.25
125	2.5
250	5

投与に先立ち、本被験物質のラットを用いる急性経口投与毒性試験(試験番号 A-04-007)において、被験物質の20および0.05 w/v%溶液について、秦野研究所で遮光下冷蔵における調製後8日間の安定性を確認し(Appendix C)、この結果に基づき、投与検体の調製は投与前8日以内に行った。また、2005年5月24日に調製した各濃度の調製検体中の被験物質含量および均一性を測定し、平均含量が調製指示濃度の 94.3～101%であり、均一性は 99.3～101%で、それぞれ規定範囲内にあったことを確認した(Appendix D、E)。

調製検体中の被験物質濃度の測定は、各調製検体を0.5 mLずつ採取し、メタノールで適宜希釈して試料溶液を調製した。別に、被験物質を必要量秤取し、メタノールに溶解して標準溶液(1、2、5 μg/mL)を調製した。試料溶液および標準溶液を高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により測定し、標準溶液から作成した検量線を用いて濃度を求めた。HPLC条件を以下に示す。

分析カラム	:	Atlantis dC_{18} (内径4.6 mm、長さ50 mm、粒子径5 μm、Waters)
移動相	:	メタノール/0.05 mol/Lリン酸塩緩衝液(pH 2.5) (1:9 v/v)
流速	:	1.0 mL/min
カラム設定温度	:	40℃
検出波長	:	294 nm
試料注入量	:	10 μL

4. 投与量の設定および投与方法

秦野研究所にて実施した TTC の反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合予備試験(試験番号 R-04-006)の結果から設定した。すなわち、雌雄ラットに 250、500 および 1000 mg/kg の TTC を 14 日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg 投与群では半数以上が赤色尿を呈し、投与 7 日までに雌雄とも全例が死亡した。500 mg/kg 投与群では、投与第 2 週から耳介の黒色斑、尾先端の暗紫色化がみられ、雌 1 例ではさらに赤色尿、流涙、削痩および鎮静を呈し、瀕死状態となった。また、同群では、雄の投与第 2 週の体重増加が抑制され、剖検時には脾臓の腫大も認められた。250 mg/kg 投与群では、被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。500 mg/kg 投与群で認められた一般状態の変化は、いずれも遅発性であり、2 週間以上の投与では重篤な症状に進行することが予想されたことから、500 mg/kg は本試験における最大耐量を凌駕する量と推察された。したがって、本試験における高用量群の投与量は 250 mg/kg に設定し、以下、公比 2 で除して中用量を 125 mg/kg、低用量を 62.5 mg/kg に設定した。

動物への投与は、雄では交配前 2 週間から最長 2 週間の交配期間を経て剖検前日に至るまでの連続 42 日間、雌は交配前 2 週間、交尾までの交配期間、妊娠期間および哺育 4 日まで(42～48 日間)、分娩しなかった雌は剖検日前日(妊娠 25 日相当)まで、サテライト群の雌は連続 42 日間、それぞれ毎日 1 回、9 時～12 時にラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は以下の通りである。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量* (mL/kg)	動物番号	
					雄	雌
1	0.5% CMC Na (媒体)	0	0	5	MX01001～012	FB01001～012
2	TTC	62.5	1.25	5	MX02001～012	FB02001～012
3	TTC	125	2.5	5	MX03001～012	FB03001～012
4	TTC	250	5	5	MX04001～012	FB04001～012
5(サテライト群)	0.5% CMC Na (媒体)	0	0	5	—	FB05001～005
6(サテライト群)	TTC	250	5	5	—	FB06001～005

*:雌雄とも最近時の体重をもとに個体別の投与液量を算出した。

回復試験動物として、雄は対照群および高用量群のうち動物番号の大きい各 5 例(動物番号 MX01008～MX01012、MX04008～MX04012)、雌はサテライト群の全例を最終投与翌日(回復 1 日)から 14 日間休薬した。

5. 観察と検査

1) 一般状態の観察

全例において、飼育期間中および回復期間中は毎日 1 回、投与期間中は投与前後の毎日 2 回以上、一般状態を観察した。

2) 詳細な症状観察

雄の詳細な症状観察は、検疫終了日(全入荷動物対象)、投与 7、14、21、28、35 および 42 日に行

い、さらに回復試験動物は回復7および14日に行った。雌の詳細な症状観察は、検疫終了日(全入荷動物対象)、投与 7、14、21、28、35 および 42 日に行い、観察日が分娩中であった例は哺育 0 日に、その他の分娩例は哺育 0 日から 4 日の間に 1 回観察し、さらにサテライト群は回復 7 および 14 日に行った。観察は、いずれも 13 時から 16 時の間に行い、スコアリング法 [1]により実施した。詳細な症状観察は、まず、ケージ越しでの観察(姿勢・体位、自発運動、発声、振戦、痙攣)を行った後、ケージから取り出す際に外表を観察し(取り出し易さ、扱い易さ、心拍動、体温、被毛、皮膚色、可視粘膜、流涙、眼球突出、瞳孔径、流涎)、作業台上での行動の正常性を観察(姿勢・体位、探索行動、身づくろい、発声、挙尾反応、歩行、常同行動、奇妙な行動、振戦、痙攣、立毛、眼裂)した。

3) 機能検査

雄では、投与42日の詳細な症状観察に引き続き、各群の動物番号の若い5例および回復観察に供する対照群および高用量群の各 5 例を、また、回復 14 日の詳細な症状観察後に、全例について機能検査を実施した。雌では、分娩例は哺育 4 日に投与期間が近接した各群の動物番号が若い 5 匹を検査した。サテライト群では、投与 42 日および回復 14 日のそれぞれ詳細な症状観察に引き続き、全例の機能検査を実施した。機能検査はプライエル反応、瞳孔反射、視覚定位、驚愕反応、後肢引込み反射、眼瞼(瞬目)反射、正向反射の有無を観察した。

4) 体重測定

雄および雌のサテライト群は、投与 1(投与開始日)、7、14、21、28、35 および 42 日、回復 1、7 および 14 日、解剖日(最終投与翌日および回復 15 日)に体重を測定した。交尾が確認されるまでの雌は、投与 1、7、14 および 21 日、交尾確認後は妊娠 0(交尾確認日)、7、14 および 20 日、分娩後は哺育 0(分娩日)および 4 日ならびに解剖日に体重を測定した。未分娩の雌は妊娠 0(交尾確認日)、7、14、20 日および 26 日相当日に体重を測定した。

5) 摂餌量測定

雄および雌のサテライト群は、投与 1～2、7～8、14～15、29～30、35～36 および 41～42 日、回復 6～7 および 13～14 日に、交配前の雌は、投与 1～2、7～8 および 14～15 日、交尾確認後は妊娠 0～1、7～8、14～15 および 20～21 日、分娩後は哺育 3～4 日に、それぞれ給餌量および残餌量を測定し、その差から摂餌量を算出した。

6) 尿検査

雄では、投与 33 日に各群の動物番号の若い 5 例および回復観察例、また、回復 13 日は全例について尿検査を実施した。雌では、投与 34 日に交尾確認日が近接した各群の動物番号の若い 5 例について尿検査を実施した。サテライト群では、投与 34 日および回復 13 日に、全例について尿検査を実施した。検査は、動物を代謝ケージに収容し、採尿開始後 4～5 時間の尿を採取し、以下の項目について検査を実施した。なお、投与期間中は、投与後に採尿を開始した。

項目	測定法	使用機器
色調・濁度	視診	
pH・潜血・蛋白・ブドウ糖・ケトン体・ウロビリノーゲン・ビリルビン	試験紙法	クリニテック 200+(バイエル・三共)
沈渣	鏡検	光学顕微鏡

7) 性周期

サテライト群を除く雌全例について、群分け前日までの性周期観察に引き続いて投与開始以降、膣スメア標本を毎日作製し、同居後交尾が確認されるまで性周期を観察した。性周期は発情期、発情前期および発情休止期に分類し、投与開始後、4 日間隔の性周期がそれ以外の性周期に変化した動物の頻度を群毎に算出した。

8) 交配

交配は、サテライト群を除く雌雄全例を 2 週間投与後(投与 15 日)の 12 週齢から、交尾を確認するまで、2 週間を限度として同群内の雌雄 1:1 で連日同居させた。交尾の確認は、膣スメア中の精子の存在あるいは膣栓を確認することにより行い、いずれかが確認された日を妊娠 0 日と起算して同居を解消し、個別に飼育した。

交配結果からは、雌雄同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数、各群の交尾率〔(交尾動物数/交配動物数)×100、%〕および子宮に着床痕が確認された動物を妊娠例として受胎率〔(妊娠動物数/交尾動物数)×100、%〕を算出した。

9) 分娩・哺育状態の観察

各群とも交尾した雌は全例を自然分娩させて哺育させた。分娩の確認は、妊娠 21 日から分娩が確認されるまで毎日行い、午前 11 時までに分娩が完了した例について、その日を哺育 0 日とした。分娩状態を直接観察できた例は異常の有無を断続的に観察し、直接観察できなかった例は分娩前後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。また、哺育 1～4 日の間は、毎日、哺育状態を観察した。

分娩した全例の妊娠期間(妊娠 0 日から分娩日までの日数)を求め、各群の出産率〔(生児出産雌数/妊娠動物数)×100、%〕を算出し、哺育 5 日の剖検時に観察した着床数および妊娠黄体数から着床率〔(着床数/妊娠黄体数)×100、%〕を算出した。

10) F_1 出生児の観察

哺育 0 日に生存児数および死亡児数を雌雄別に数えて、性別および外表奇形の有無を観察し、分娩率〔(産児数/着床痕数)×100、%〕、生児出産率〔(出産生児数/着床痕数)×100、%〕および出生率〔(出産生児数/産児数)×100、%〕を算出した。哺育 1～4 日まで毎日、一般状態を観察し、生児数と死亡児数を雌雄別に数え、新生児生存率〔(哺育 4 日の生児数/哺育 0 日の生児数)×100、%〕を算出し

た。生存児については、哺育 0 および 4 日に個別の体重を測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出するとともに、哺育 0 および 4 日における性比〔(雄生児数/総生児数)×100、%〕を算出した。

11) 剖検および採血

雄の投与終了時剖検例は投与 42 日の翌日に、回復観察例は回復 15 日に解剖した。また、雌の分娩例は哺育 4 日の翌日に、未分娩例は妊娠 26 日相当日、サテライト群は回復 15 日に解剖した。全例、いずれも解剖前 18～22 時間絶食させた後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死あるいは採血後に放血致死させて解剖し、血液学検査、血液生化学検査および病理学検査を実施した。なお、採血は、腹部後大静脈から以下の①、②、③の順で行い、雄の投与終了時剖検では各群の動物番号が若い5例、回復15日における剖検では全例で採血を行った。また、雌の投与終了時剖検では、分娩例について哺育4日に投与期間が近接した各群の動物番号が若い5例、サテライト群は全例で採血を行った。

①血液学検査用採血:抗凝固剤 クエン酸ナトリウム
②血液学検査用採血:抗凝固剤 EDTA-2K
③血液生化学検査用採血:抗凝固剤 ヘパリン

12) 血液学検査

抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて採取した血液から血漿を分離して、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間を測定し、その他の項目は抗凝固剤として EDTA-2K を用いて採取した血液で測定した。なお、採血時に検査の補助として静脈血塗抹標本(Wright-Giemsa 染色)を作製したが、標本観察は実施しなかった。また、網状赤血球比率については、採血時にニューメチレンブルー染色標本を作製し、Brecher 法を用いて網状赤血球比率の算出を行った。

項目	測定法	使用機器
赤血球数 (RBC)	電気抵抗法	血液自動分析装置 CELL-DYN3500(ｱﾎﾞｯﾄ)
白血球数 (WBC)	フローサイトメトリー・ レーザー光散乱法/電気抵抗法	同上
白血球分類	同上	同上
血色素量 (Hb)	吸光度法	同上
平均赤血球容積 (MCV)	電気抵抗法	同上
血小板数	同上	同上
ヘマトクリット値 (Ht)	計算(RBC×MCV×0.001)	
平均赤血球血色素量(MCH)	計算(Hb×1000/RBC)	
平均赤血球血色素濃度(MCHC)	計算(Hb×100/Ht)	
網状赤血球比率	Brecher 法	光学顕微鏡
ﾌﾟﾛﾄﾛﾝﾋﾞﾝ時間 (PT)	光散乱検出法	全自動血液凝固測定装置 CA-1000(シスメックス)
活性部分ﾄﾛﾝﾎﾞﾌﾟﾗｽﾁﾝ時間 (APTT)	同上	同上

13) 血液生化学検査

前述の血液学検査のための採血に引き続き、抗凝固剤としてヘパリンを用いて採取した血液から血漿を分離して、以下の項目について検査した。

項目	測定法	使用機器
総蛋白濃度	ﾋﾞｳﾚｯﾄ法	生化学自動分析装 COBAS MIRA plus(ﾛｼｭ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ)
ｱﾙﾌﾞﾐﾝ濃度	BCG 法	同上
総ｺﾚｽﾃﾛｰﾙ濃度	ｺﾚｽﾃﾛｰﾙｵｷｼﾀﾞｰｾﾞ･HDAOS 法	同上
ｸﾞﾙｺｰｽ濃度	ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ･G-6-PDH 法	同上
尿素窒素濃度	ｳﾚｱｰｾﾞ･GIDH 法	同上
ｸﾚｱﾁﾆﾝ濃度	Jaffé 法	同上
ｱﾙｶﾘﾌｫｽﾌｧﾀｰｾﾞ (ALP) 活性	GSCC 法	同上
ｱｽﾊﾟﾗｷﾞﾝ酸ｱﾐﾉﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ (AST) 活性	IFCC 法	同上
ｱﾗﾆﾝｱﾐﾉﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ (ALT) 活性	同上	同上
γ-ｸﾞﾙﾀﾐﾙﾄﾗﾝｽﾍﾟﾌﾟﾁﾀﾞｰｾﾞ (γ-GTP) 活性	同上	同上
ﾄﾘｸﾞﾘｾﾗｲﾄﾞ濃度	GPO･HDAOS(ｸﾞﾘｾﾘﾝ消去)法	同上
無機ﾘﾝ濃度	ﾓﾘﾌﾞﾃﾞﾝ酸直接法	同上
総ﾋﾞﾘﾙﾋﾞﾝ濃度	酵素法	同上
ｶﾙｼｳﾑ濃度	OCPC 法	同上
A/G 比	計算	
ﾅﾄﾘｳﾑｲｵﾝ濃度	ｲｵﾝ電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (ｴｲｱﾝﾄﾞﾃｨｰ)
ｶﾘｳﾑｲｵﾝ濃度	同上	同上
塩素ｲｵﾝ濃度	同上	同上

14) 病理学検査

(1) 肉眼的観察

全例を剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行った。雌雄ともに血液学検査および血液生化学検査を実施した動物の脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量(実重量)を測定し、比体重値(相対重量)を算出した。また、全例の脳、下垂体、脊髄、心臓、気管、肺(気管支を含む)、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、甲状腺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、凝固腺を含む精嚢、卵巣、子宮、腟、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨および骨髄、および病変部を採取し、保存した。肺は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で注入固定してから採取した。子宮は着床数を数え、分娩例の卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた。採取した器官・組織のうち、精巣ならびに精巣上体はブアン液(長期保存は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液を使用)に固定し、その他は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定した。

(2) 病理組織学検査

死亡動物は全保存器官について標本を作製し、病理組織学検査を実施した。卵巣、精巣および精

巣上体は全例、肉眼的観察で変化がみられた病変部は該当動物のみについて、これ以外の器官・組織は、雄の投与終了時剖検および雌の分娩例では対照群と 250 mg/kg 群のうち、血液学検査および血液生化学検査を実施した各 5 例について病理組織学検査を実施した。その結果、250 mg/kg 投与群では腎臓、副腎および肝臓に異常が認められたことから、投与期間終了時の 62.5 および 125 mg/kg 投与群、さらには回復期間終了時の雌雄についても病理組織学検査を実施した。これらの器官・組織はパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、光学顕微鏡を用いて検査した。さらに、腎臓については褐色色素の沈着が認められたことから、雄の対照群および 250 mg/kg 投与群の各 2 例について、特殊染色(Berlin blue 染色および Schmorl 反応)を実施した。なお、骨髄とともに採取した大腿骨は、病理組織学検査の対象から除外した。

15) 出生児の剖検

出生児のうち、死亡児は発見後すみやかに剖検し、0.1Mリン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定して保存した。生存児は全例を哺育 4 日にエーテル吸入により致死させ剖検した。

6. データ解析法

性周期の変化した動物の頻度および受胎率については Fisher の直接確率検定を行った(有意水準:5%)。

被験物質投与群の病理組織学検査所見のうち、グレード分けしたデータは Mann-Whitney の U 検定(有意水準:5%)により、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定(有意水準:5%)により対照群との間で有意差検定を行った。

その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは腹ごとの平均値を 1 標本とし、サテライト群内あるいはその他の群内で比較した。その際、解析の対象が 2 群の場合には、まず F 検定を行い、有意差が認められなければ Student の t 検定を行った。F 検定において有意差が認められた場合は、Aspin-Welch 検定を行った。解析の対象が 3 群以上の場合は、先ず、Bartlett の方法により各群の分散の一様性について検定(有意水準:5%)を行った。分散が一様である場合には、一元配置型の分散分析(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められた場合は、Dunnett 法により多重比較を行った(有意水準:5%)。一方、いずれかの群で分散が 0 となる場合および分散が一様でなかった場合には、Kruskal-Wallis の順位検定(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った(有意水準:5%)。

試験成績

1. 反復投与毒性および回復性試験

1) 一般状態(Table 1～2、Appendix 1～2)

250 mg/kg投与群の雄1例(動物番号 MX04001)が投与8日に、同群の雌1例(動物番号 FB04011)が哺育 1 日(投与 40 日)に死亡が確認された。雄の死亡例では、一般状態の変化は観察されなかったが、雌の死亡例では、死亡当日に半眼および削痩が観察された。

250 mg/kg 投与群の生存例では、耳介黒色斑が雄 1 例および雌 3 例(サテライト群 1 例含む)、尾先端暗紫色が雄 2 例、尾結節が雄 4 例および雌 1 例(サテライト群)、耳介結節が雄 1 例および雌 1 例、削痩が雄 1 例および雌 1 例、貧血様が雄 1 例、陰嚢硬化が雄 1 例、陰嚢結節が雄 3 例、左前肢腫脹が雄 1 例、鼻吻部痂皮が雌 1 例に認められた。赤色尿は 125 mg/kg 投与群の雄 1 例、250 mg/kg 投

与群の雄3例および同群の雌1例に認められ、投与直後の一過性の流涎は125 mg/kg投与群の雄6例、250 mg/kg投与群の雄8例および同群の雌10例(サテライト群4例含む)に認められた。その他、脱毛が対照群の雌2例(サテライト群1例含む)、125 mg/kg投与群の雄1例、雌1例および250 mg/kg投与群の雌1例(サテライト群)に認められ、背側頸部痂皮が62.5 mg/kg投与群の雌1例に、外陰部周囲性の腫瘤が125 mg/kg投与群の雌1例に認められた。

上記以外の雌および雄には、投与期間中および回復期間中を通して一般状態の変化は認められなかった。

2) 詳細な症状観察(Table 3～4、Appendix 3～4)

ケージ越しの観察では、立ち上がりや睡眠が数例みられたが、対照群とTTC各投与群との間に頻度の差は認められなかった。ケージからの取り出し易さは、ハンドリング時に奇声を発する例や怯えて抵抗する例が雌雄各投与群で散見された他、ケージ内を走り回る例が250 mg/kg投与群の雌1例(サテライト群, 動物番号 FB06003)で認められた。ハンドリング時の扱い易さについても奇声を上げる例やハンドリングされることに抵抗する例が雌雄とも各投与群で散見され、125 mg/kg 投与群(動物番号 FB03004)および250 mg/kg投与群(サテライト群, 動物番号 FB06003)の雌では、各1例に抵抗あるいは硬直する例が認められた。皮膚の色・可視粘膜の状態は、250 mg/kg投与群の雄で潮紅(動物番号 MX04009)および貧血様(動物番号 MX04006)が各 1 例に認められた。その他、軽度の挙尾反応が対照群を含む各投与群で散見され、常同行動として後肢立ちが250 mg/kg投与群(サテライト含む)の雌2例(動物番号 FB04011、 FB06002)に認められた。

上記以外の観察項目には、異常は認められなかった。

3) 機能検査(Table 5～6、Appendix 5～6)

投与期間終了時および回復期間終了時ともに、いずれの群においても異常は認められなかった。

4) 体重(Fig. 1～3、Table 7～12、Appendix 7～12)

投与期間中、250 mg/kg投与群の雄の体重実測値は投与21日以降回復14日まで、体重増加量は投与7日から35日まで、累積体重増加量は投与14日から42日まで、対照群と比較して有意に低値を示した。また同群(サテライト群)の雌の体重実測値は投与42日以降回復14日まで、体重増加量は投与21日から投与35日まで、累積体重増加量は投与35日から42日まで、対照群と比較して有意に低値を示した。

125 mg/kg以下のTTC投与群においては、雌雄とも投与期間中および回復期間中を通して対照群との間に有意差は認められなかった。

5) 摂餌量(Fig. 4～6、Table 13～14、Appendix 13～14)

投与期間中、250 mg/kg投与群の雄において、投与7～8日および投与29～30日の摂餌量が対照群に比較して有意な低値を示した。また、同群の雌サテライト群で、投与1～2日の摂餌量が雌サテライ

ト群の対照群に比較して有意な低値を示した。

125 mg/kg以下のTTC投与群においては、雌雄とも投与期間中および回復期間中を通して摂餌量の有意な変化は認められなかった。

6) 尿検査(Table 15～16、Appendix 15～16)

投与期間中の尿定性検査では、250 mg/kg 投与群の雄 1 例に僅かな濁りが認められた。尿潜血は対照群の雄および 250 mg/kg 投与群の雄に各 1 例ずつ認められた。尿沈渣の検査では、250 mg/kg 投与群の雄 6 例に赤血球が認められた。

回復期間中の尿定性検査では、尿潜血が 250 mg/kg 投与群の雄 1 例(投与期間中と同一例)にみられた他、尿沈渣の検査では、250 mg/kg 投与群の雄 2 例に赤血球が認められた。

上記以外の雄雌では、尿定性検査および尿沈渣にみられた変化はいずれも正常の範囲内であった。

7) 血液学検査(Table 17～18、Appendix 17～18)

投与期間終了時の検査では、250 mg/kg 投与群の雄でヘマトクリット値が対照群に比較して有意に低下し、網状赤血球比の増加傾向が認められた。雌では、いずれの TTC 投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

回復期間終了時の検査では、250 mg/kg 投与群の雌で血色素量、ヘマトクリット値、MCV および MCH がいずれも対照群と比較して有意に低下した。雄では対照群と 250 mg/kg 投与群との間に有意差は認められなかった。

8) 血液生化学検査(Table 19～20、Appendix 19～20)

投与期間終了時の検査では、62.5 および 250 mg/kg 投与群の雄で血中アルブミン濃度が対照群と比較して有意に低下し、また、250 mg/kg 投与群の雄にクレアチニン濃度の有意な低下が認められた。雌では、いずれの TTC 投与群においても対照群との間に有意な差は認められなかった。

回復期間終了時の検査では、250 mg/kg 投与群の雄および雌でクレアチニン濃度が対照群に比較して有意に低下した。また、250 mg/kg 投与群の雌でトリグリセライド濃度が対照群と比較して有意に増加した。

9) 病理学検査

1) 器官重量(Table 21～22、Appendix 21～22)

投与期間終了時の検査では、250 mg/kg 投与群の雄で解剖時体重が対照群に比較して有意に低下を示し、脳、心臓、腎臓および副腎の相対重量が対照群に比較して有意に増加した。雌ではいずれの TTC 投与群においても対照群との間に有意な差は認められなかった。

回復期間終了時の検査では、250 mg/kg 投与群の雄で解剖時体重、肝臓および腎臓の実重量が対照群に比較して有意に低下し、脳、心臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の相対重量が対

照群に比較して有意に増加した。250 mg/kg 投与群の雌は、解剖時体重および胸腺の実重量が対照群に比較して有意に低下し、脳、心臓および肝臓の相対重量が対照群と比較して有意に増加した。

2) 剖検所見

(1) 試験期間途中の死亡例(Appendix 23～24)

投与 8 日に死亡した 250 mg/kg 投与群の雄(動物番号 MX04001)では、肺が退縮不全および浮腫様を呈しており、腎臓の腫大および暗赤色化が観察された。哺育 1 日に死亡した 250 mg/kg 投与群の雌(動物番号 FB04011)でも、肺および胸腺が浮腫様を呈しており、腎臓の腫大および淡色化が観察された他、脾臓は淡色化を伴う小型化、さらに骨髄の淡色化も生じていた。

(2) 投与期間終了時の雌雄(Table 23～24、Appendix 23～24)

250 mg/kg 投与群の雄では、片側の精巣上体尾部に膿瘍および黄色域が各 1 例にみられ、このうちの 1 例を含む 2 例には、両側あるいは片側の尾部に陰嚢との癒着が認められた。また、腎臓の腫大が 2 例、右側腎臓表面の粗造化が 1 例、脾臓の小型化が 1 例に認められ、尾の結節あるいは同部位先端部に皮膚の暗赤色域が 3 例に認められた。その他、62.5 mg/kg 投与群の雄 1 例に腎臓の腫大および肝臓の白色斑が認められた。

250 mg/kg 投与群の雌では、一般状態で削痩が認められた 1 例に脾臓および胸腺の小型化、腺胃粘膜に陥凹部および黒色斑が認められた他、耳介の結節あるいは同部位の皮膚に黒色斑が 3 例に認められた。125 mg/kg 投与群の雌では、左側腎臓の嚢胞、外陰部周囲の皮下腫瘤、腺胃粘膜の黒色斑および肝臓の白色斑が各 1 例ずつ認められた。対照群の雌では、脾臓の白色結節および腹部皮膚の脱毛が各 1 例認められた。

(3) 回復試験期間終了時の雌雄(Table 25～26、Appendix 25～26)

250 mg/kg 投与群の雄 1 例に、片側の精巣上体尾部に結節および陰嚢との癒着がみられ、陰嚢部の皮膚に結節、耳介の皮膚に黒色斑が観察された。同群雌 1 例に、鎖骨部皮膚の脱毛が観察された。

3) 病理組織学所見

(1) 試験期間途中の死亡例(Appendix 27～28)

雄の死亡例(動物番号 MX04001)では、精巣および精巣上体に異常所見は認められなかった。同例では、胸腺の萎縮、肺にうっ血および浮腫、腎臓の皮質に中等度な硝子円柱とごく軽度な好塩基性尿細管、心臓にごく軽度な限局性の心筋の変性/線維化がみられた。なお、同例の脾臓は、剖検時自己融解を生じていたため評価対象から除外した。

雌の死亡例(動物番号 FB04011)では、卵巣に異常所見は認められなかった。同例では、腎臓の皮質に近位尿細管の広範囲な壊死や空胞化、皮質あるいは髄質に硝子円柱、乳頭部の間質への細胞浸潤を伴う浮腫や鉱質沈着、腎盂の移行上皮に限局性の過形成がみられた。また、胸腺の萎縮、肺に軽度のうっ血、副腎に索状帯細胞のびまん性肥大、肝臓に小葉中間帯の肝細胞空胞化、脾臓に髄外

造血および褐色色素の沈着に加えて赤脾髄領域の減少がみられた。なお、同例の脊髄は、剖検時採取不可能であったため、標本作製および観察を実施しなかった。

(2) 投与期間終了時の雄(Table 27、Appendix 27)

精巣では、対照群および125 mg/kg投与群の各1例、62.5 mg/kg投与群の3例、250 mg/kg投与群の2例に限局性の精細管萎縮がみられた。

精巣上体では、精巣に異常が認められた例のうち、対照群の1例を除く例の管腔内に細胞残屑がみられたほか、125および250 mg/kg投与群の他の各2例でも、同様に細胞残屑がみられた。細胞残屑が観察された250 mg/kg投与群の4例に、間質へのリンパ球およびマクロファージの浸潤がみられ、白膜に毛細血管の増生を伴う限局性の線維化(Photo 1)と精子、細胞残屑、線維素あるいはマクロファージの付着がみられた。その他、250 mg/kg投与群の2例に、精子肉芽腫がみられた。また、125 mg/kg投与群にも、間質へのリンパ球およびマクロファージの浸潤を伴う精子肉芽腫、白膜に毛細血管の増生を伴う限局性の線維化が各1例ずつにみられた。

腎臓では、62.5 mg/kg投与群の4例、125および250 mg/kg投与群の全例の乳頭部に浮腫がみられ、そのうち250 mg/kg投与群の1例では、間質に好中球の浸潤および好塩基性尿細管を伴う壊死(Photo 2)がみられた。同様に、対照群の1例、62.5および125 mg/kg投与群の各4例、250 mg/kg投与群の2例の乳頭部に鉱質沈着がみられたが、そのうち250 mg/kg投与群の1例の変化は、他の例に比較してその程度が強く、好塩基性尿細管もみられた。また、TTC各投与群の1例ずつに、皮質の間質への細胞浸潤がみられた。一方、対照群の4例および125 mg/kg投与群の2例に好酸性小体がみられたが、62.5および250 mg/kg投与群には認められなかった。さらに、TTC投与群の全例で皮質の近位尿細管に褐色色素の沈着がみられたものの、このうち250 mg/kg投与群の変化は、他のTTC投与群と比較して程度が軽減していた。なお、雄の対照群および250 mg/kg投与群の各2例について実施した腎臓のBerlin blue染色およびSchmorl反応では、いずれの例も陽性反応を示さなかった。また、TTC各投与群の皮質に好塩基性尿細管がみられたが、対照群との間に程度および頻度の差は認められなかった。その他、皮質に限局性の鉱質沈着および硝子円柱、皮髄境界部に限局性の嚢胞、腎盂に移行上皮の限局性の過形成、腎盂や移行上皮への好中球およびリンパ球の浸潤が1～2例にみられたが、投与の影響を示唆する変化ではなかった。

副腎では、62.5 mg/kg投与群の1例、125および250 mg/kg投与群の全例で皮質に索状体細胞のびまん性肥大(Photo 3、4)がみられ、そのうち250 mg/kg投与群の変化は、他の例と比較して程度が増強する傾向が認められた。

肝臓では、対照群およびTTC各投与群の全例に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化、対照群の1例を除く全例に小肉芽腫がみられ、そのうち250 mg/kg投与群の小肉芽腫は、対照群と比較してその程度がやや増強する傾向が認められた。また、125および250 mg/kg投与群の各1例に小葉中心性の単細胞壊死、62.5 mg/kg投与群の1例の尾状葉に鉱質沈着を伴う限局性の線維化がみられた。

心臓では、対照群の2例および250 mg/kg投与群の1例にごく軽度な限局性の心筋の変性/線維化がみられた。

肺では、250 mg/kg投与群の1例の肺胞内に限局した泡沫細胞の集簇がみられた他、対照群には、動脈壁に鉱質沈着、肺胞に限局性の骨化生または気管支肺動脈に限局性の線維化が1～2例にみられた。

脾臓では、対照群および250 mg/kg投与群の全例に髄外造血および褐色色素の沈着がみられたが、両群間に程度の差は認められなかった。

前立腺では、対照群の全例および250 mg/kg投与群の3例に間質や上皮への好中球およびリンパ球の浸潤がみられたが、両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

剖検時に異常が認められた250 mg/kg投与群の2例の陰嚢では、皮下織に多核巨細胞を伴う肉芽組織がみられた他、そのうち 1 例には、鞘膜と筋層、皮下織への好中球およびマクロファージの浸潤もみられた。さらに、尾に結節が認められた250 mg/kg投与群の2例のうち1例には、皮下織に多核巨細胞を伴う肉芽組織および動脈に血栓、真皮への好中球、マクロファージおよびリンパ球の浸潤がみられたが、他の1例には異常所見は認められなかった。同様に、尾の変色が認められた250 mg/kg投与群の 2 例には、皮下織に多核巨細胞を伴う肉芽組織、真皮および皮下織への好中球、マクロファージおよびリンパ球の浸潤、褐色色素の沈着を伴う出血がみられた他、痂皮の付着がみられた。

その他の病理組織学検査実施器官に、異常所見は認められなかった。

(3) 投与期間終了時の雌(Table 28、Appendix 28)

卵巣では、異常所見は認められなかった。

腎臓では、対照群および250 mg/kg投与群の各2例、62.5 mg/kg投与群の3例、125 mg/kg投与群の1例の皮質に好塩基性尿細管がみられたが、そのうち125および250 mg/kg投与群の各1例は、他と比較して変化の程度が強かった他、125 mg/kg 投与群の例には、皮質に限局性の嚢胞、250 mg/kg 投与群の例には、皮質の近位尿細管の空胞化、皮質あるいは髄質に硝子円柱、遠位尿細管の拡張および乳頭部に浮腫がみられた。なお、近位尿細管の空胞化は250 mg/kg投与群の他の1例にもみられた。また、TTC投与群の全例で、皮質の近位尿細管に褐色色素の沈着がみられたが、このうち250 mg/kg投与群の変化は、他のTTC投与群と比較して程度が軽減していた。

副腎では、62.5および125 mg/kg投与群の各1例、250 mg/kg投与群の4例に、索状帯細胞のびまん性の肥大がみられた。

肝臓では、対照群の4例、62.5および125 mg/kg投与群の全例、250 mg/kg投与群の3例に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化、対照群および250 mg/kg投与群の各2例、62.5 mg/kg投与群の3例および125 mg/kg投与群の1例に小肉芽腫がみられたが、対照群とTTC各投与群との間に頻度および程度の明らかな差は認められなかった。その他、TTC投与群には、胆管の過形成、髄外造血、クッパー細胞の過形成、被膜下に限局性の壊死あるいは線維化が1～2例にみられた。

下垂体では、対照群および250 mg/kg投与群の各1例にラトケ嚢の拡張がみられた。

肺では、対照群および250 mg/kg投与群の各2例の肺胞に、限局した泡沫細胞の集簇がみられた他、対照群の1例には動脈壁に鉱質沈着がみられた。

胸腺では、250 mg/kg投与群の1例に著しい萎縮が認められた。また、同例では腺胃粘膜のびらん

と粘膜固有層に好中球およびマクロファージの浸潤を伴う浮腫がみられた。

脾臓では、対照群および250 mg/kg投与群の全例に髄外造血および褐色色素の沈着がみられたが、両群間に程度の差は認められなかった。また、剖検時に白色結節がみられた対照群の1例に出血および好中球の浸潤を伴う限局性の壊死巣、胸腺の萎縮がみられた250 mg/kg投与群の1例に赤脾髄領域の減少がみられた。

剖検時に異常が認められた250 mg/kg投与群の3例の耳介では、皮下織に多核巨細胞を伴う肉芽組織、真皮や皮下織への好中球、リンパ球およびマクロファージの浸潤がみられたほか、そのうち 2 例の筋層には限局性の変性が、1 例の表皮には好中球およびリンパ球の浸潤を伴う痂皮の付着がみられた。その他、剖検時に外陰部周囲の皮下に腫瘤が観察された 125 mg/kg 投与群の 1 例には、乳腺腺腫がみられ、肝臓に白色斑が観察された 125 mg/kg 投与群の 1 例には、被膜下に限局性の壊死あるいは線維化、髄外造血および門脈周囲性の肝細胞の脂肪化がみられた。なお、皮膚の脱毛部に関しては、被験物質の投与量に相関していないため、病理組織学検査は行わなかった。

その他の病理組織学検査実施器官に、異常所見は認められなかった。

(4) 回復試験期間終了時の雌雄(Table 29～30、Appendix 29～30)

精巣では、250 mg/kg 投与群の 1 例に限局性の精細管萎縮がみられた。

精巣上体では、対照群の 1 例および 250 mg/kg 投与群の 2 例の管腔内に細胞残屑がみられ、そのうち250 mg/kg投与群の2例では、白膜に毛細血管の増生を伴う限局性の線維化や精子、細胞残屑、線維素あるいはマクロファージの付着がみられた。精巣に異常が認められた例には、精巣上体の間質にリンパ球およびマクロファージの浸潤を伴う精子肉芽腫がみられた。

卵巣では、250 mg/kg 投与群の 1 例に黄体の減少が認められた。

腎臓では、250 mg/kg投与群の雄3例の乳頭部に壊死および浮腫が、同群雌全例の乳頭部に浮腫がみられた。また、250 mg/kg 投与群の雌雄全例で皮質の近位尿細管に褐色色素の沈着(Photo 5)がみられた。好塩基性尿細管は、対照群および250 mg/kg投与群の雌雄でみられ、250 mg/kg投与群の雌の頻度は対照群より増加していた。その他、好酸性小体、腎臓被膜に限局性の線維化、乳頭部に限局性の鉱質沈着がそれぞれ雄 1～2 例にみられた。

副腎では、250 mg/kg 投与群の雄全例の皮質に、索状帯細胞のびまん性の肥大がみられたが、その程度は投与期間終了時の剖検と比較するとやや軽減していた。対照群の雄および雌全例に変化は認められなかった。

肝臓では、対照群および 250 mg/kg 投与群の雌雄全例に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化、対照群の雄全例、雌 3 例および 250 mg/kg 投与群の雄全例、雌 4 例に小肉芽腫がみられたが、それぞれ両群間に程度の明らかな差は認められなかった。その他、対照群および250 mg/kg投与群の雄各2例に小葉中心性の単細胞壊死がみられた。

剖検時に異常が認められた250 mg/kg投与群の雄1例の陰嚢では、皮下織に多核巨細胞を伴う肉芽組織、好中球、マクロファージおよびリンパ球の浸潤、筋層および鞘膜への好中球およびマクロファージの浸潤がみられた。同例の耳介では、好中球、マクロファージおよびリンパ球の浸潤を伴う肉芽組

織、痂皮の付着がみられた。なお、皮膚の脱毛部に関しては、被験物質の投与量に相関していないため、病理組織学検査は行わなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 性周期および交配成績(Table 31～32、Appendix 31～32)

性周期の観察では、交配前の投与期間中、4/5 日周期(4 日および 5 日間隔で発情を回帰)を示した動物が 125 mg/kg 投与群で 1 例(動物番号 FB03004)、250 mg/kg 投与群で 1 例(動物番号 FB04004)、long cycle(6 日間隔以上で発情を回帰)を示した動物が 250 mg/kg 投与群で 1 例(動物番号 FB04005)認められたが、その頻度には対照群と比較して有意な差は認められなかった。

交配成績では全例が交尾したが、250 mg/kg 投与群で 3 例(動物番号 FB04005, FB04006, FB04008)の不妊が認められた。しかし、受胎率、さらには交尾までの日数およびその間の発情回数に、対照群と TTC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 分娩および哺育所見(Table 33、Appendix 33)

妊娠動物の全例が生児を出産し、妊娠期間は対照群と TTC 各投与群との間に有意差は認められなかった。また、妊娠動物の全例について分娩状態の異常は認められなかったが、哺育 1 日に死亡した 250 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 FB04011)で哺育児を集めない状態が観察された。上記以外の母動物では、哺育状態の異常は観察されなかった。

3) 黄体数および着床数(Table 33、Appendix 33)

250 mg/kg 投与群において黄体数が対照群と比較して有意に減少した。しかし、着床数および着床率に、対照群と TTC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

4) 出生児所見

(1) 生存(Table 33、Appendix 33)

250 mg/kg 投与群においては生後 0 日の雄性産児数が対照群と比較して有意に減少したが、生後 0 日の性比は対照群との間に有意差は認められなかった。また、生後 4 日の雄性産児数は対照群との間に有意な差は認められなかった。

上記以外の産児数、分娩率、出産生児数、生児出産率、出生率、哺育 4 日の生児数、新生児生存率および生後 4 日の性比に、対照群と TTC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

(2) 体重(Table 34、Appendix 34)

250 mg/kg 投与群の 1 腹(動物番号 FB04012)で哺育 0 日から哺育 4 日までの体重増加が抑制されたが、群平均の哺育児体重には、対照群と TTC 各投与群との間で有意差は認められなかった。

(3) 形態観察所見(Table 35)

哺育 0 日の生存産児の形態観察、死亡児および哺育 4 日の剖検時の形態観察において、いずれ

の動物にも形態異常は観察されなかった。250 mg/kg 投与群では、哺育 1 日に母動物が死亡した腹(動物番号 FB04011)の生存産児 6 匹に頭部、胸部、腹部または前肢に 1～6 個の白色結節を認めた。

考察

1. 反復投与毒性および回復性試験

トリチオシアヌル酸を 42 日間反復経口投与した結果、250 mg/kg 投与群では雌雄各 1 例が死亡した。雄の死亡例は死亡までに症状の変化は観察されなかったが、病理組織検査で肺にうっ血および浮腫が認められていることから、死因は呼吸抑制によるものと推察される。雌の死亡例は分娩の翌日に半眼および削痩を呈し、死亡が確認されていることから、分娩時の負荷が死亡発現を誘発した可能性も考えられるが、病理組織検査で腎皮質の近位尿細管に広範囲の壊死が認められたことから、死因は腎不全と推察される。本試験の死亡例でみられた病理所見は、ラットを用いる急性経口投与毒性試験(試験番号 A-04-074)の死亡例にも認められていることから、いずれも被験物質の投与により誘発されたものと判断される。

生存例では、250 mg/kg 投与群の雌雄に耳介や尾に結節や変色部が認められ、同群の雄では陰嚢にも硬化部や結節が認められた。これらの変化は休薬中も継続してみられ、同部位の病理組織検査ではいずれも皮下織に多核巨細胞を伴う肉芽組織と炎症細胞浸潤が確認された。耳介または尾の病変は、Koschier らの行った 16 日間の混餌投与試験 [2]でも報告されていることから、被験物質の投与により誘発された変化と考えられるが、今回の試験ではその発現機序の特定までには至らなかった。

その他、125 mg/kg 以上の雄および 250 mg/kg 投与群の雌で少数例に赤色尿が観察された。250 mg/kg 投与群の雄では尿沈渣に赤血球、投与終了時の血液検査ではヘマトクリット値の低下と網状赤血球比率の増加が認められ、腎臓の病理組織検査では乳頭部の壊死や浮腫が認められていることから、赤色尿は腎乳頭部からの出血が原因と考えられ、軽度の貧血を呈していたと推察される。休薬後の検査でも、雌の血液学検査に貧血を示唆する変化がみられていることから、14 日間の休薬では回復しない変化と考えられる。また、腎乳頭部の浮腫は、雄の 62.5 mg/kg 以上の投与群と雌の 250 mg/kg 投与群で高頻度にみられているが、250 mg/kg 投与群以外では、症状および臨床検査項目に関連した変化が認められていないことから、機能面ではほとんど影響を及ぼしていないと判断される。腎臓の組織検査では、62.5 mg/kg 以上の投与群で近位尿細管に褐色色素の沈着も観察されたが、褐色色素は Berlin Blue 染色および Schmol 反応に陰性であったことから、ヘモジデリンまたはリポフスチン色素である可能性は低く、被験物質由来の色素である可能性が考えられる。

雄の 125 mg/kg 以上の投与群および雌の 250 mg/kg 投与群で投与後に流涎が認められたが、その程度は軽く、投与直後にしか認められていないことから、被験物質の苦味によって惹起されたものと推定される。

詳細な症状観察では、125 および 250 mg/kg 投与群の雌でハンドリング時に抵抗する例や作業台上で後肢立ちする例がみられたが、いずれも 1～2 例のみでの所見であることから、被験物質の影響を

示唆する変化ではないと判断される。その他、ケージから取り出す際に抵抗する例や作業台上で挙尾反応を示す例が各投与群で散見されたが、用量に依存した変化ではなかった。機能検査でも異常は認められていないことから、本被験物質の投与により神経毒性は誘発されないと考えられる。

体重推移については、250 mg/kg 投与群の雄で明らかな体重増加抑制と摂餌量の低下が認められた。同様の変化は 16 日間の混餌投与試験[1)]においても認められており、さらに本試験においては休薬に伴い体重増加抑制が消失したことから、体重増加抑制は被験物質の投与に起因した変化と考えられる。雌においては 250 mg/kg 投与群のサテライト群で体重増加抑制と摂餌量の低下が認められたものの、妊娠あるいは哺育中の雌には明らかな体重増加抑制はみられなかったことから、その作用は妊娠または哺育によって軽減すると推定される。また、250 mg/kg 投与群で剖検時にみられた血中アルブミン濃度の低下は、この体重増加抑制に関連した変化と推察される。同群でみられた血中クレアチニン濃度の低下については、原因不明であるが、増加性の変化でないことから、毒性学的意義はないと考えられる。

剖検時の器官重量測定では、250 mg/kg 投与群の雄で腎臓の相対重量が有意に増加し、実重量も有意差はないが増加していることから、被験物質の影響と考えられ、それらは乳頭部の壊死や浮腫に関連した変化と推定される。同群では脳、心臓、副腎などの相対重量も有意に増加したが、副腎以外の器官については、病理組織学検査で重量増加を示唆する変化はみられていないことから、被験物質の投与による体重増加抑制の結果、解剖時の体重が低下したことによる相対的な変化と考えられる。副腎の病理組織学検査では 62.5 mg/kg 以上の投与群で索状細胞のびまん性肥大が観察され、休薬後の検査でも同様の傾向が確認されたことから、副腎重量の増加は被験物質投与の影響と考えられる。肝臓では、250 mg/kg 投与群の雄において小肉芽腫の程度がやや増強する傾向が認められたことから、被験物質の肝臓への影響が疑われるが、血液生化学検査や肝臓重量に有意な変化は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

250 mg/kg 投与群では 12 例中 3 例で不妊が認められたが、その他の投与群では全例が妊娠していることから、被験物質の受胎能への影響が疑われる。不妊雌の1例については、交配前の性周期が 4 日周期を示さなかった例であるが、不妊雄の 3 例中 2 例で剖検時に精巣上体の異常が認められていることから、不妊の原因は雄動物にあると推察される。しかしながら、不妊雄の精巣の病理組織検査では異常が認められていないことから、生殖細胞への直接的な影響ではなく、陰嚢との癒着がみられた精巣上体の異常が原因と推察される。精巣や精巣上体の病理組織学検査では、不妊例以外の雄で精細管萎縮や管内細胞残屑がみられているが、いずれも限局性で軽微な変化であることから、被験物質の毒性を示唆するものではないと判断した。

250 mg/kg 投与群では黄体数の減少が観察され、着床率に有意な変化が認められなかったことから、同群の平均排卵数が減少した可能性が考えられる。しかし、性周期に明瞭な影響はみられず、卵巣の病理組織検査でも異常は観察されていないことから、黄体数の減少が被験物質の投与により誘発された変化か否かは判断できなかった。なお、同群では、生後 0 日の雄の産児数が減少したが、性比に有

意差がみられていないことから、黄体数の減少に伴った変化と推定される。

出生児の生存性に関しては、被験物質投与の影響を示唆する変化は認められず、出生児の体重についても、群平均体重には被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。250 mg/kg 投与群の 1 腹で体重増加の抑制が認められたが、この母動物においては哺育期に削痩が認められ、病理組織検査では腎臓、胸腺、胃などに異常が観察されていることから、母動物の一般状態の悪化に伴う授乳量の減少が原因と推察される。さらに、出生児の形態についても、死亡児および哺育 0 日の形態観察、さらには哺育 4 日の剖検時に異常が観察されていないことから、本被験物質は出生児の発育・分化に影響を及ぼさないと判断される。なお、250 mg/kg 投与群では、母動物が死亡した後に観察した哺育児の体表に白色結節を認めたが、1 腹のみの変化であり、哺育 0 日には異常が観察されていないことから、被験物質の投与に起因した所見ではないと判断した。

3. 無作用量

本試験条件下でのトリチオシアヌル酸の反復投与毒性に関する無作用量は 62.5 mg/kg 以上の投与群で腎臓の近位尿細管に色素沈着と、副腎皮質の索状帯細胞にびまん性肥大が認められたことから、雌雄とも 62.5 mg/kg/day 未満と判断された。また、生殖発生毒性に関する無作用量は、250 mg/kg 投与群で不妊が認められたことから、125 mg/kg/day と判断された。

参考文献

1) Katherine, L.M., Virginia, C.M.: Utility of a neurobehavioral screening battery for differentiating the effects of two pyrethroids, permethrin and cypermethrin. Neurotoxicol. Teratol. 15:71-83 (1993)

2) Koschier, F.J., Brown, D.R., Friedman, M.A., et al.: Effect of dietary administration of the rubber curative trithiocyanuric acid to the rat. Food Chem. Toxic. 21 : 495-498 (1983)

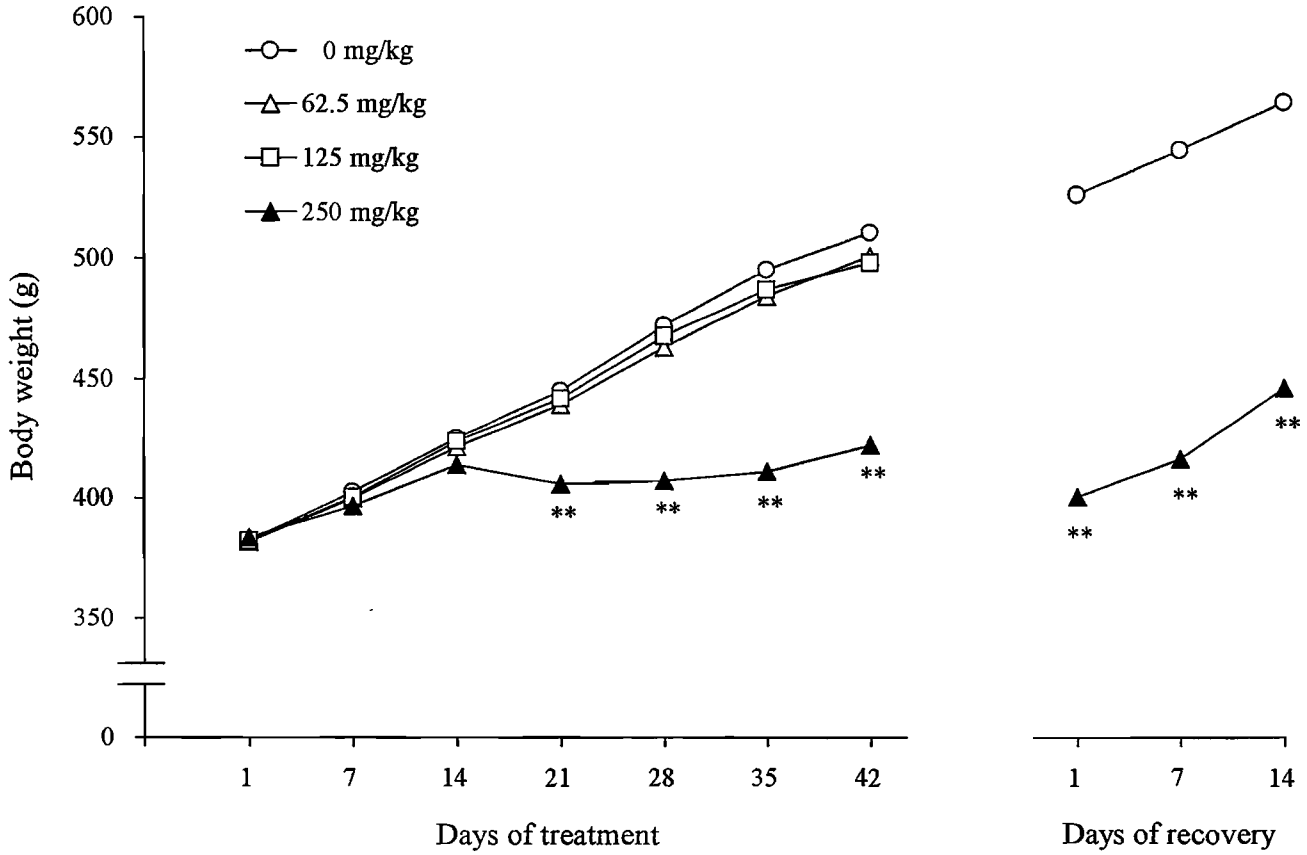


Fig.1 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats
Body weight of males.

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

** significantly different from control, $p<0.01$

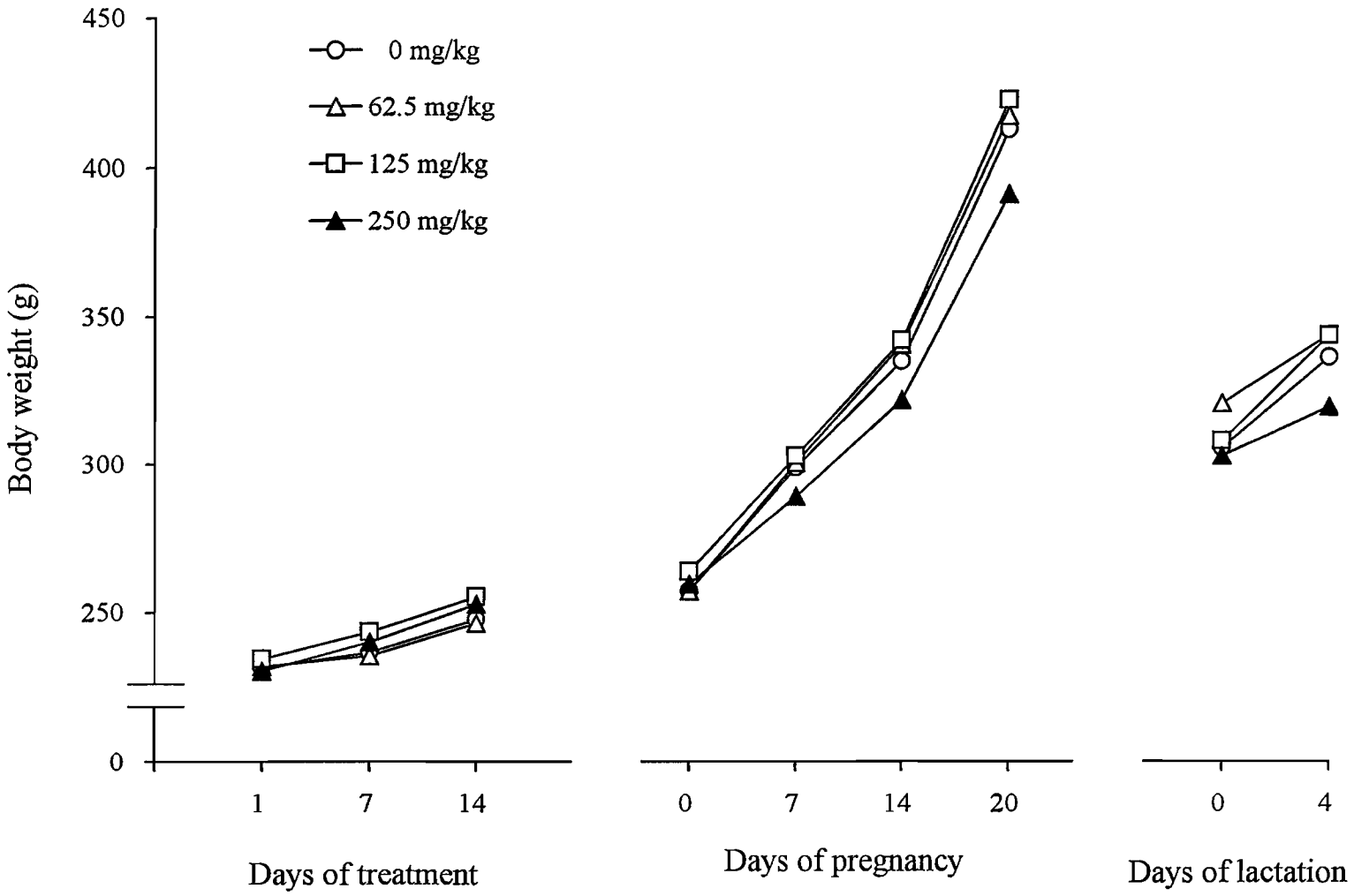


Fig.2 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats.
Body weight of dams.

TTC:1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

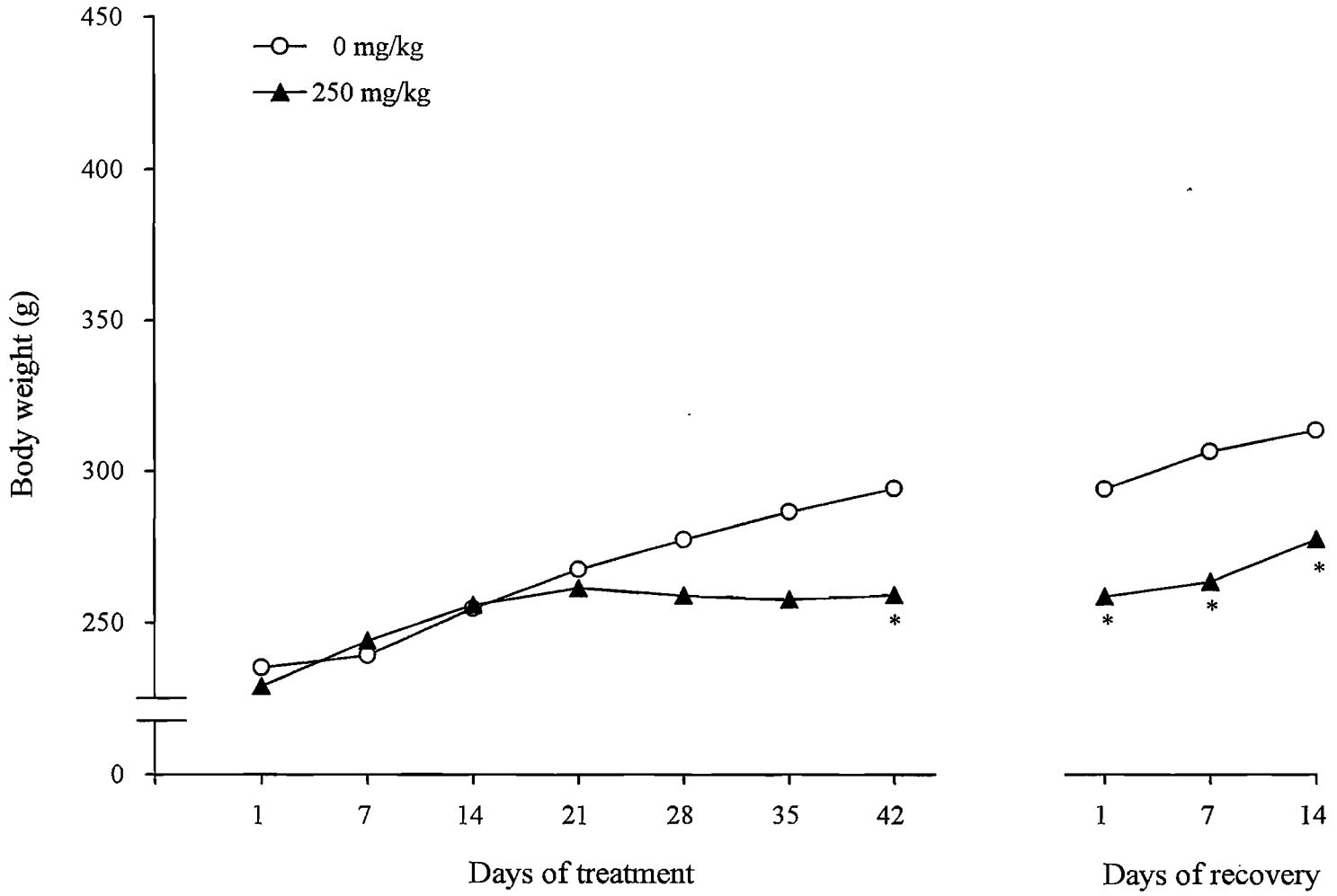


Fig.3 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats.
Body weight of female satellite groups.

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

* significantly different from control, $p<0.05$

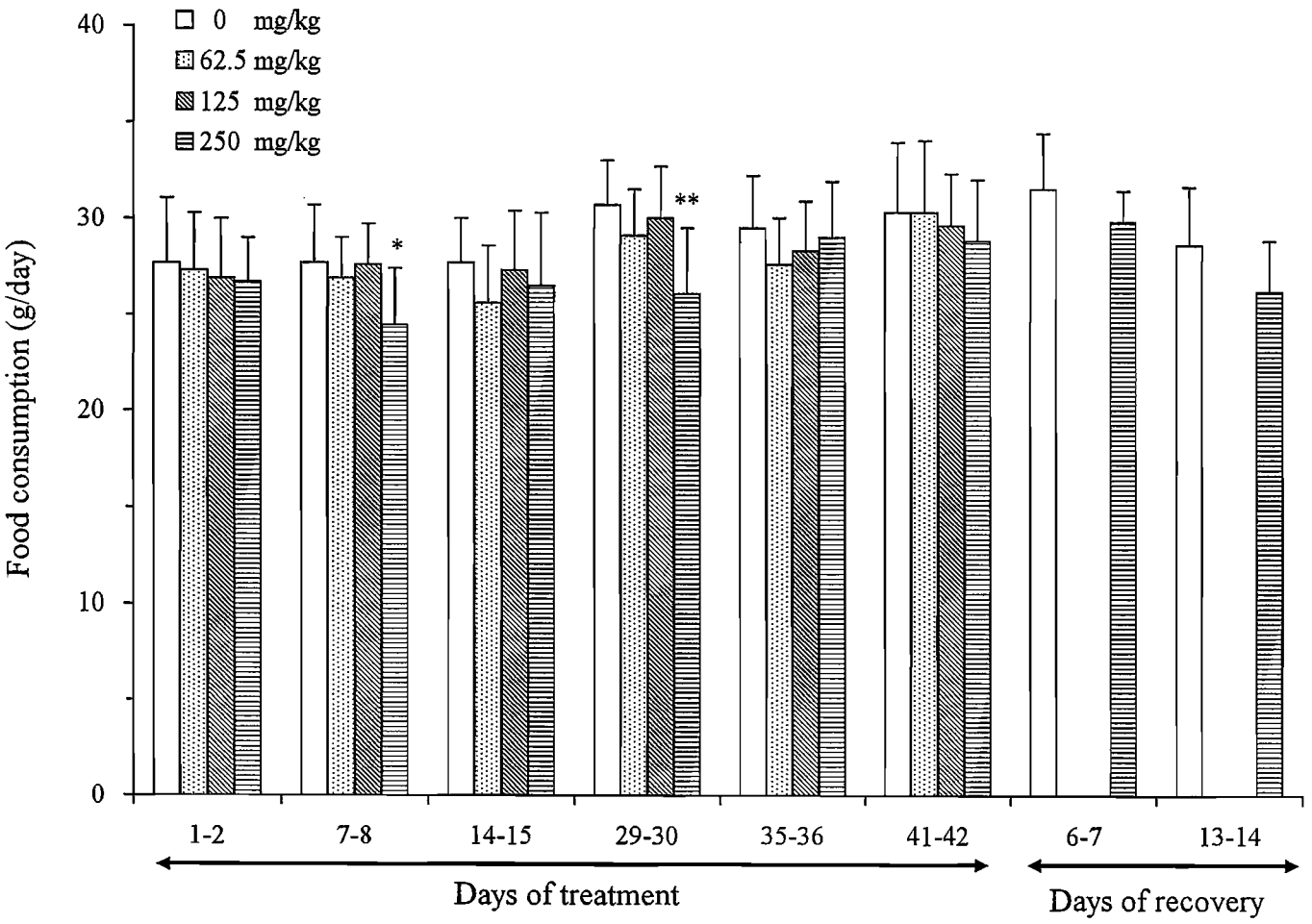


Fig.4 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats.
Food consumption of males.

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
* significantly different from control, $p<0.05$
** significantly different from control, $p<0.01$

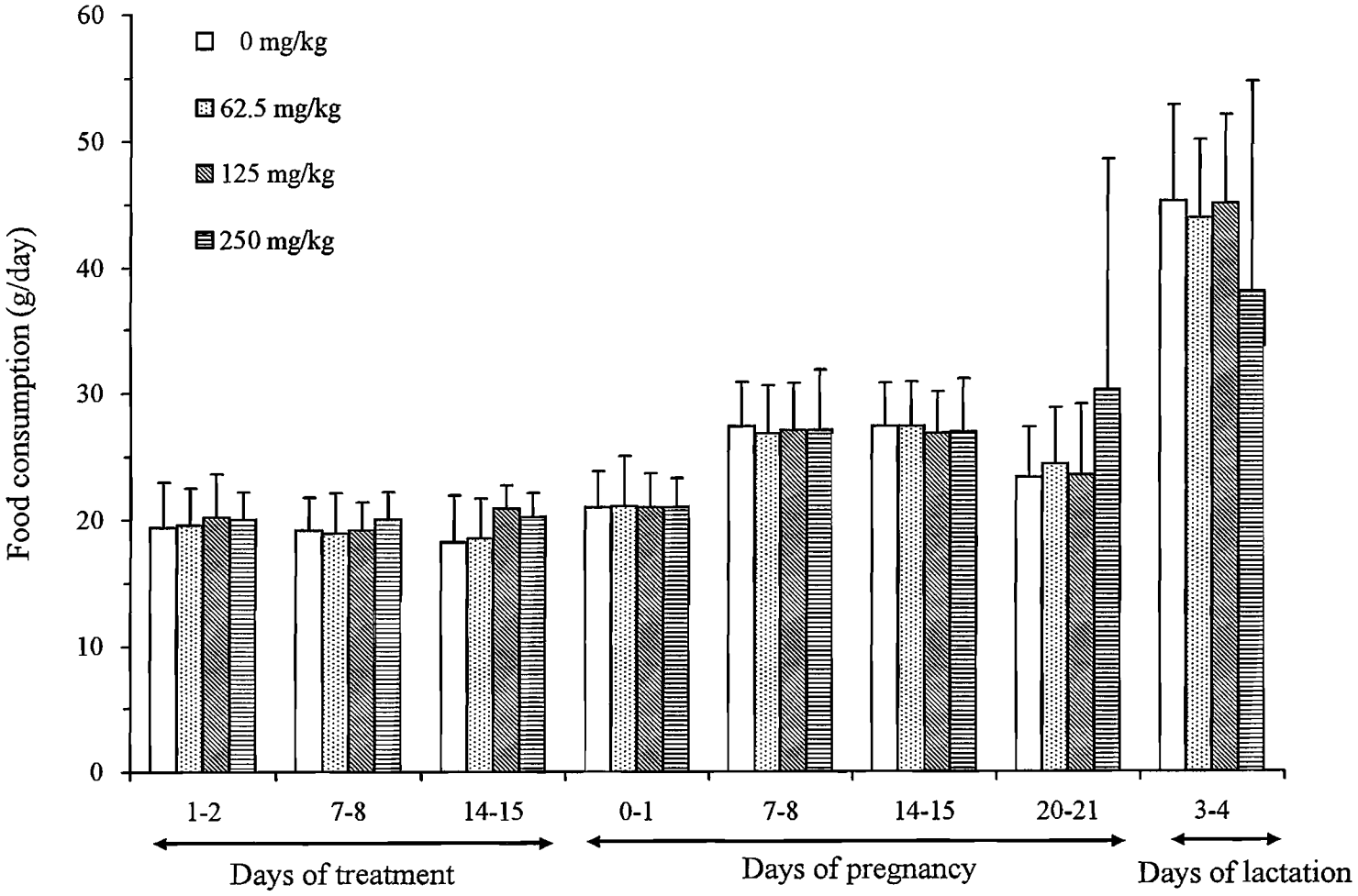


Fig.5 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats
Food consumption of dams.

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

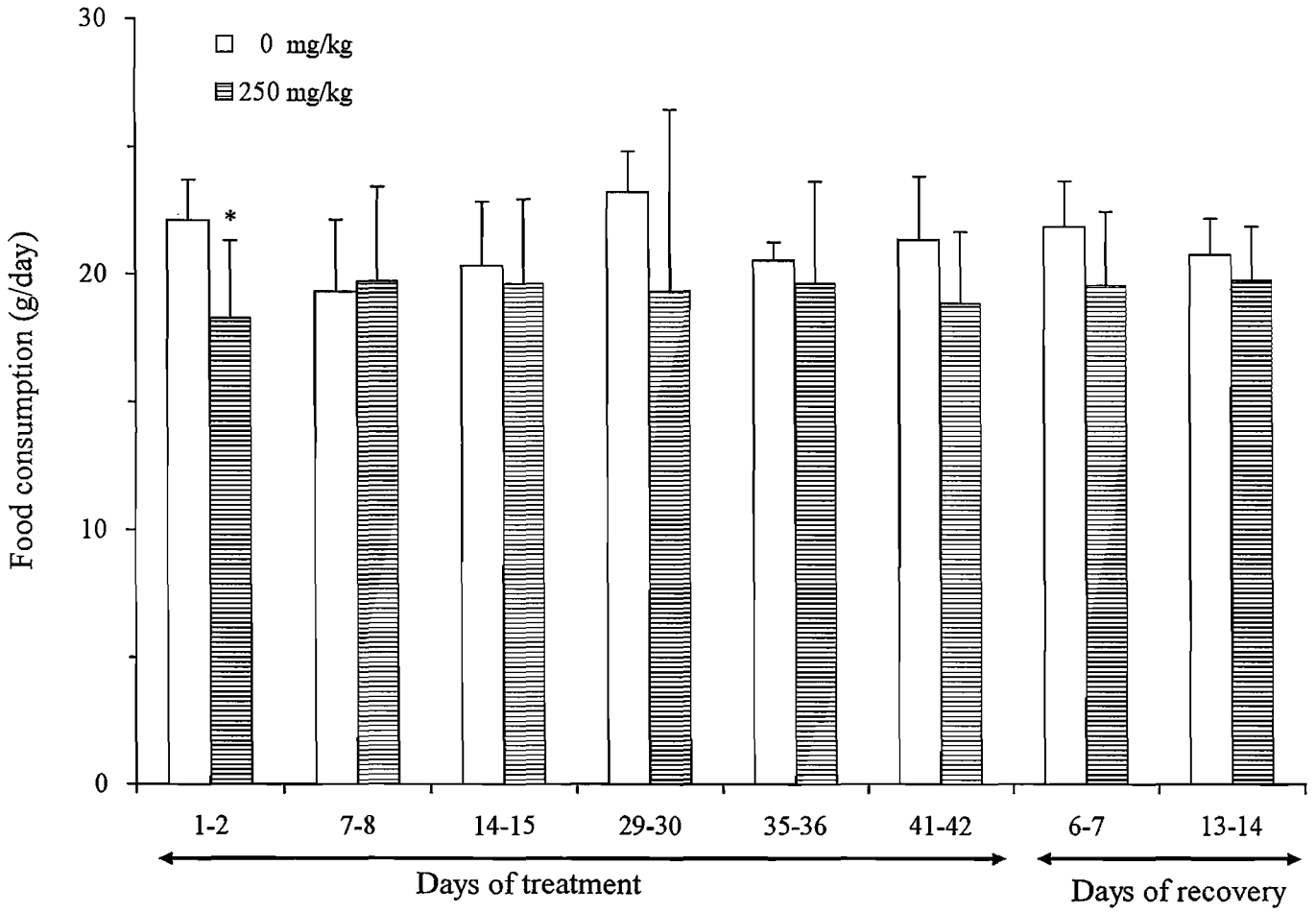


Fig.6 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats.
Food consumption of female satellite groups.

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

* significantly different from control, $p<0.05$

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione by Oral Administration in Rats

Table no.	Appendix no.	Table title
1	1-1～1-4	Clinical signs of males
2-1～2-2	2-1-1～2-2-2	Clinical signs of females
3	3-1～3-4	Detailed clinical observations of males
4-1～4-2	4-1-1～4-2-2	Detailed clinical observations of females
5	5-1～5-4	Functional findings of males and females at the end of dosing period
6	6-1～6-2	Functional findings of males and females at the end of recovery period
7	7-1～7-4	Body weight of males
8	8-1～8-4	Body weight gain of males
9	9-1～9-4	Cumulative body weight gain of males
10-1～10-2	10-1-1～10-2-2	Body weight of females
11-1～11-2	11-1-1～11-2-2	Body weight gain of females
12-1～12-2	12-1-1～12-2-2	Cumulative body weight gain of females
13	13-1～13-4	Food consumption of males
14-1～14-2	14-1-1～14-2-2	Food consumption of females
15	15-1～15-4	Findings in urinalysis of males
16-1～16-2	16-1-1～16-2-2	Findings in urinalysis of females
17	17-1～17-4	Hematological findings of males and females at the end of dosing period
18	18-1～18-2	Hematological findings of males and females at the end of recovery period
19	19-1～19-4	Biochemical findings of males and females at the end of dosing period
20	20-1～20-2	Biochemical findings of males and females at the end of recovery period
21	21	Absolute and relative organ weight of males and females at the end of dosing period
22	22	Absolute and relative organ weight of males and females at the end of recovery period
23	23	Macroscopic findings of males at the end of dosing period
24	24	Macroscopic findings of females at the end of dosing period
25	25	Macroscopic findings of males at the end of recovery period
26	26	Macroscopic findings of females at the end of recovery period
27	27	Histopathological findings of males at the end of dosing period
28	28	Histopathological findings of females at the end of dosing period
29	29	Histopathological findings of males at the end of recovery period
30	30	Histological findings of females at the end of recovery period
31	31-1～31-4	Estrous cycle of dams
32	32-1～32-4	Reproductive performance of animals
33	33-1～33-4	Development of pups up to day 4 of lactation
34	34-1～34-4	Mean body weight of pups up to day 4 of lactation
35		Morphological observations of pups

Table 1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Clinical signs of males

Clinical sings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs								
			Days of treatment						Days of recovery [b]		Total
			1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	1-7	8-14	
Death	0 [a]	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	0	0	0			0
	250	12	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Black area of the pinna	0 [a]	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	0	0	0			0
	250	12	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Dark purple distally of the tail	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	0	0	0			0
	250	12	0	0	1	2	2	2	0	0	2
Reddish urine	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	1	0	0			1
	250	12	1	1	2	2	2	2	1	0	3
Nodule of the tail	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	0	0	0			0
	250	12	0	2	4	4	4	4	2	2	4
Salivation (Only after the treatment)	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	5	1	6			6
	250	12	0	4	3	6	5	7	0	0	8
Loss of fur	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	1	1	1			1
	250	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nodule of the pinna	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	0	0	0			0
	250	12	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Emaciation	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	0	0	0			0
	250	12	0	0	1	1	1	1	0	0	1
Anemic	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	0	0	0			0
	250	12	0	0	1	1	1	1	0	0	1
Induration of the scrotum	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	0	0	0			0
	250	12	0	1	1	1	1	0	0	0	1
Nodule of the scrotum	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	0	0	0			0
	250	12	0	1	2	2	2	3	2	2	3
Swelling of the left forelimb	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0			0
	125	12	0	0	0	0	0	0			0
	250	12	0	0	0	0	0	1	1	1	1

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

[b] the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 250 mg/kg groups

Table 2-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Clinical signs of females, dams

Clinical sings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs							
			Days of treatment							Total
			1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	
Death	0 [a]	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	0	0	0	1	0	1
Black area of the pinna	0 [a]	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	12	0	1	2	2	2	1	1	2
Reddish urine	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	1	1	0	0	0	1
Salivation (Only after the treatment)	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	12	0	3	2	5	0	0	0	6
Loss of fur	0	12	0	0	0	1	1	1	0	1
	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	1	1	0	0	0	0	1
	250	12	0	0	0	0	0	0	0	0
Nodule of the pinna	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	0	0	0	1	1	1
Emaciation	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	0	0	0	1	1	2
Crust fomation of the dorsal neck	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	1	0	0	0	0	1
	125	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	0	0	0	0	0	0
Mass of the perineal region	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	0	1	1	1	1	1
	250	12	0	0	0	0	0	0	0	0
Crust formation of the snout	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	0	0	1	1	1	1
Incomplete eyelid opening	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	0	0	0	1	0	1

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 2-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Clinical signs of females, satellite groups

Clinical sings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs								
			Days of treatment						Days of recovery		Total
			1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	1-7	8-14	
Black area of the pinna	0 [a]	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	5	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Nodule of the tail	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	5	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Salivation (Only after the treatment)	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	5	0	3	0	0	0	2	0	0	4
Loss of fur	0	5	0	1	1	1	1	1	0	0	1
	250	5	0	0	0	1	1	1	1	1	1

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 3
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Detailed clinical observations of males

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Pre-treatment	Days of treatment						Days of recovery [b]	
				7	14	21	28	35	42	7	14
[Posture in home-cage]	0 [a]	12	0 [c]	1	1	1	1	0	0	0	0
Rearing	62.5	12	0	1	0	0	0	0	0		
	125	12	0	0	0	0	0	0	0		
	250	12	0	1	0	0	0	1	0	0	0
[Home-cage activity]	0	12	0 [c]	0	1	7	5	6	4	2	0
Asleep	62.5	12	0	2	2	3	5	3	4		
	125	12	0	1	1	5	4	5	2		
	250	12	2	2	1	2	5	3	7	5	0
[Ease of removing rat from cage]	0	12	24 [d]	4	6	6	10	0	6	4	2
Very easy (score 0)	62.5	12	2	4	4	4	4	2	2		
Vocalization without resistance (score 2)	125	12	8	4	6	4	6	6	2		
Rat flinched (score 4)	250	12	4	4	2	4	4	2	0	0	0
[Reactivity to being handled]	0	12	18 [d]	4	8	4	10	0	6	4	8
Very low (score 0)	62.5	12	4	4	2	4	4	0	2		
Vocalization without resistance (score 2)	125	12	6	4	4	2	6	12	4		
Slight resistance to being handled (score 4)	250	12	8	2	2	6	6	2	0	0	2
[Skin/mucous membranes color]	0	12	0 [c]	0	0	0	0	0	0	0	0
Flush	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0		
	125	12	0	0	0	0	0	0	0		
	250	12	0	0	1	0	1	0	0	0	0
[Skin/mucous membranes color]	0	12	0 [c]	0	0	0	0	0	0	0	0
Anemic	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0		
	125	12	0	0	0	0	0	0	0		
	250	12	0	0	0	1	1	1	1	0	0
[Straub tail]	0	12	0 [c]	0	0	0	0	0	0	0	0
None (score 0)	62.5	12	0	0	0	4	0	0	0		
Slight (score 4)	125	12	0	0	0	0	0	0	4		
	250	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
[b] the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 250 mg/kg groups
[c] Values represent number of animals with the findings.
[d] Values represent total score of each group.

Table 4-1
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Detailed clinical observations of females, dams

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Pre-treatment	Days of treatment					The lactation period
				7	14	21	28	35	
[Posture in home-cage]	0 [a]	12	2 [b]	2	3	0	0	0	1
Rearing	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	4	1	1	1	0	2
	250	12	1	1	3	1	1	0	0
[Home-cage activity]	0	12	0 [b]	0	0	1	2	6	3
Asleep	62.5	12	1	1	2	2	5	6	5
	125	12	0	0	1	1	4	6	2
	250	12	1	1	0	1	2	7	2
[Ease of removing rat from cage]									
Very easy (score 0)	0	12	8 [c]	4	4	4	2	4	0
Vocalization without resistance (score 2)	62.5	12	12	4	10	6	8	4	0
Rat flinched (score 4)	125	12	18	4	14	6	6	2	0
Runs around cage (score 6)	250	12	10	2	4	4	2	0	0
[Reactivity to being handled]	0	12	10 [c]	8	6	8	4	2	0
Very low (score 0)	62.5	12	12	14	12	6	8	2	2
Vocalization without resistance (score 2)	125	12	16	18	18	14	14	4	0
Slight resistance to being handled (score 4)									
Resitance to being handled (score 6)	250	12	16	14	14	8	6	6	0
[Straub tail]	0	12	4 [c]	8	0	8	8	4	20
None (score 0)	62.5	12	12	8	8	4	8	4	4
Slight (score 4)	125	12	8	4	4	8	0	4	12
	250	12	4	4	4	0	0	0	8 [d]
[Stereotypy]	0	12	0 [c]	0	0	0	0	0	0
Rearing	62.5	12	0	0	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	0	0	0	0	0
	250	12	0	1	0	0	0	0	0 [d]

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
[b] Values represent number of animals with the findings.
[c] Values represent total score of each group.
[d] Eight animals were examined in the lactation period

Table 4-2
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Detailed clinical observations of females, satellite groups

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Pre-treatment	Days of treatment						Days of recovery [b]	
				7	14	21	28	35	42	7	14
[Posture in home-cage] Rearing	0 [a]	5	0 [c]	2	1	1	0	2	0	0	1
	250	5	0	1	1	0	1	0	0	0	0
[Home-cage activity] Asleep	0	5	0 [c]	1	0	0	0	0	0	1	0
	250	5	1	0	0	0	0	0	1	2	0
[Ease of removing rat from cage] Very easy (score 0) Vocalization without resistance (score 2) Rat flinched (score 4) Runs around cage (score 6)	0	5	6 [d]	2	6	4	2	2	2	2	2
	250	5	4	6	0	2	2	4	0	2	2
[Reactivity to being handled] Very low (score 0) Vocalization without resistance (score 2) Slight resistance to being handled (score 4)	0	5	8 [d]	4	8	2	2	2	2	6	2
	250	5	8	8	4	4	6	8	4	6	8
[Straub tail] None (score 0) Slight (score 4)	0	5	4 [d]	8	8	4	4	4	0	8	4
	250	5	4	0	0	0	0	0	4	8	4
[Stereotypy] Rearing	0	5	0 [c]	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na soltuion (5 mL/kg)
[b] the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 250 mg/kg groups
[c] Values represent number of animals with the findings.
[d] Values represent total score of each group.

Table 5

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC in rats

Functional findings of males and females at the end of dosing period

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Male				
Number of animals	10	5	5	10
Prayer's reaction	100	100	100	100
Pupillary reflex	100	100	100	100
Visual placing	100	100	100	100
Startle reaction	100	100	100	100
Withdrawal reflex	100	100	100	100
Eyelid reflex	100	100	100	100
Righting reflex	100	100	100	100
Female, dam				
Number of animals	5	5	5	5
Prayer's reaction	100	100	100	100
Pupillary reflex	100	100	100	100
Visual placing	100	100	100	100
Startle reaction	100	100	100	100
Withdrawal reflex	100	100	100	100
Eyelid reflex	100	100	100	100
Righting reflex	100	100	100	100
Female, satellite group				
Number of animals	5			5
Prayer's reaction	100			100
Pupillary reflex	100			100
Visual placing	100			100
Startle reaction	100			100
Withdrawal reflex	100			100
Eyelid reflex	100			100
Righting reflex	100			100

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Values represent % of animals showing normal responses.

Table 6

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC in rats

Functional findings of males and females at the end of recovery period

Compound	TTC	
Dose (mg/kg)	0[a]	250
Male		
Number of animals	5	5
Prayer's reaction	100	100
Pupillary reflex	100	100
Visual placing	100	100
Startle reaction	100	100
Withdrawal reflex	100	100
Eyelid reflex	100	100
Righting reflex	100	100
Female, satellite group		
Number of animals	5	5
Prayer's reaction	100	100
Pupillary reflex	100	100
Visual placing	100	100
Startle reaction	100	100
Withdrawal reflex	100	100
Eyelid reflex	100	100
Righting reflex	100	100

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Values represent % of animals showing normal responses.

Table 7

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Body weight of males (g)

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Days of treatment				
1 (initial body weight)	382.2 ± 14.3 (12)	381.6 ± 14.2 (12)	382.2 ± 12.9 (12)	383.4 ± 13.0 (12)
7	402.4 ± 17.5 (12)	399.9 ± 14.9 (12)	400.3 ± 14.1 (12)	396.7 ± 16.5 (12)
14	425.0 ± 21.3 (12)	421.2 ± 16.6 (12)	423.7 ± 12.2 (12)	413.7 ± 18.0 (11)
21	444.8 ± 26.3 (12)	439.0 ± 17.5 (12)	441.7 ± 14.9 (12)	405.6 ± 31.4 ** (11)
28	471.7 ± 29.0 (12)	463.0 ± 20.6 (12)	467.4 ± 17.5 (12)	407.1 ± 35.3 ** (11)
35	494.9 ± 31.8 (12)	483.8 ± 22.0 (12)	486.5 ± 20.3 (12)	410.8 ± 36.5 ** (11)
42	510.4 ± 32.6 (12)	500.5 ± 23.5 (12)	497.8 ± 23.2 (12)	421.9 ± 38.4 ** (11)
Days of recovery				
1	526.0 ± 15.5 (5)			400.0 ± 27.9 ** (5)
7	544.1 ± 19.7 (5)			415.8 ± 24.3 ** (5)
14	564.0 ± 25.9 (5)			445.6 ± 18.3 ** (5)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

** significantly different from control, $p<0.01$

Table 8

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Body weight gain of males (g)

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Days of treatment				
1 - 7	20.3 ± 6.0 (12)	18.4 ± 4.4 (12)	18.1 ± 7.3 (12)	13.3 ± 8.0 (12)
7 -14	22.6 ± 6.4 (12)	21.3 ± 5.2 (12)	23.5 ± 5.2 (12)	15.1 ± 5.1 ** (11)
14 -21	19.8 ± 8.8 (12)	17.8 ± 5.8 (12)	18.0 ± 9.1 (12)	-8.1 ± 18.9 ** (11)
21 -28	26.9 ± 6.2 (12)	24.0 ± 5.9 (12)	25.7 ± 7.1 (12)	1.5 ± 10.3 ** (11)
28 -35	23.2 ± 4.3 (12)	20.8 ± 3.8 (12)	19.1 ± 7.2 (12)	3.7 ± 10.5 ** (11)
35 -42	15.5 ± 6.1 (12)	16.7 ± 8.4 (12)	11.2 ± 7.0 (12)	11.1 ± 10.4 (11)
Days of recovery				
1 - 7	18.2 ± 9.8 (5)			15.8 ± 4.2 (5)
7 -14	19.8 ± 10.2 (5)			29.8 ± 11.3 (5)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
Values represent mean±S.D. (N)
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
** significantly different from control, $p<0.01$

Table 9

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Cumulative body weight gain of males (g)

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Days of treatment				
1 - 7	20.3 ± 6.0 (12)	18.4 ± 4.4 (12)	18.1 ± 7.3 (12)	13.3 ± 8.0 (12)
1 -14	42.8 ± 10.9 (12)	39.6 ± 8.1 (12)	41.6 ± 9.0 (12)	28.8 ± 11.6 ** (11)
1 -21	62.7 ± 14.8 (12)	57.5 ± 10.1 (12)	59.5 ± 15.7 (12)	20.7 ± 28.8 ** (11)
1 -28	89.5 ± 17.3 (12)	81.4 ± 14.3 (12)	85.2 ± 18.5 (12)	22.2 ± 32.3 ** (11)
1 -35	112.7 ± 20.2 (12)	102.2 ± 14.7 (12)	104.4 ± 21.5 (12)	25.9 ± 34.3 ** (11)
1 -42	128.3 ± 21.6 (12)	118.9 ± 19.1 (12)	115.6 ± 24.4 (12)	37.0 ± 35.7 ** (11)
Days of recovery				
1 - 7	18.2 ± 9.8 (5)			15.8 ± 4.2 (5)
1 -14	38.0 ± 17.7 (5)			45.6 ± 15.4 (5)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

** significantly different from control, $p<0.01$

Table 10-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Body weight of females, dams (g)

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Days of treatment				
1 (initial body weight)	231.6 ± 11.7 (12)	231.9 ± 9.5 (12)	234.4 ± 11.2 (12)	230.4 ± 9.5 (12)
7	236.7 ± 10.4 (12)	235.6 ± 6.8 (12)	243.6 ± 14.8 (12)	240.2 ± 8.7 (12)
14	247.8 ± 13.8 (12)	246.3 ± 10.4 (12)	255.4 ± 18.4 (12)	252.8 ± 9.6 (12)
Days of pregnancy				
0	257.2 ± 15.9 (11)	257.3 ± 13.3 (12)	263.7 ± 17.2 (12)	259.6 ± 9.7 (9)
7	298.6 ± 14.5 (11)	300.2 ± 18.4 (12)	302.5 ± 17.8 (12)	288.8 ± 15.6 (9)
14	334.6 ± 15.3 (11)	340.3 ± 21.3 (12)	341.7 ± 22.5 (12)	321.5 ± 25.7 (9)
20	411.9 ± 18.0 (11)	416.5 ± 28.4 (12)	421.9 ± 26.3 (12)	390.6 ± 36.6 (9)
Days of lactation				
0	308.2 ± 21.5 (12)	320.1 ± 27.9 (12)	307.4 ± 30.1 (12)	302.2 ± 35.5 (9)
4	339.2 ± 18.9 (12)	343.2 ± 22.3 (12)	342.9 ± 20.0 (12)	318.8 ± 36.8 (8)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 10-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Body weight of females, satellite groups (g)

Compound	TTC	
Dose (mg/kg)	0[a]	250
Days of treatment		
1 (initial body weight)	235.3 ± 9.2 (5)	229.3 ± 8.1 (5)
7	239.3 ± 18.0 (5)	244.1 ± 14.1 (5)
14	254.8 ± 15.4 (5)	255.8 ± 20.9 (5)
21	267.5 ± 18.2 (5)	261.4 ± 19.3 (5)
28	277.3 ± 15.9 (5)	258.8 ± 21.5 (5)
35	286.5 ± 19.9 (5)	257.5 ± 23.2 (5)
42	294.0 ± 22.7 (5)	259.0 ± 23.7 (5) *
Days of recovery		
1	293.9 ± 23.2 (5)	258.5 ± 24.4 (5) *
7	306.1 ± 20.4 (5)	263.2 ± 26.3 (5) *
14	313.3 ± 21.8 (5)	277.1 ± 25.0 (5) *

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

* significantly different from control, $p<0.05$

Table 11-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Body weight gain of females, dams (g)

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Days of treatment				
1 -7	5.1 ± 8.6 (12)	3.7 ± 9.0 (12)	9.2 ± 6.6 (12)	9.8 ± 7.2 (12)
7 -14	11.1 ± 6.6 (12)	10.7 ± 7.6 (12)	11.8 ± 6.7 (12)	12.6 ± 7.2 (12)
Days of pregnancy				
0 - 7	41.5 ± 3.2 (11)	42.9 ± 10.3 (12)	38.8 ± 7.9 (12)	29.2 ± 12.4 (9)
7 -14	35.9 ± 3.8 (11)	40.1 ± 5.6 (12)	39.2 ± 8.1 (12)	32.7 ± 10.6 (9)
14 -20	77.3 ± 9.1 (11)	76.2 ± 10.0 (12)	80.2 ± 9.7 (12)	69.1 ± 13.2 (9)
Days of lactation				
0 - 4	31.0 ± 15.9 (12)	23.2 ± 19.9 (12)	35.5 ± 25.5 (12)	8.9 ± 23.9 (8)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 11-2
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats
Body weight gain of females, satellite groups (g)

Compound	TTC							
Dose (mg/kg)	0[a]				250			
Days of treament								
1 - 7	3.9	±	12.4	(5)	14.8	±	7.2	(5)
7 -14	15.6	±	6.6	(5)	11.7	±	7.2	(5)
14 -21	12.7	±	6.3	(5)	5.6	±	7.8	(5)
21 -28	9.8	±	5.2	(5)	-2.5	±	5.3 **	(5)
28 -35	9.2	±	5.1	(5)	-1.3	±	6.4 *	(5)
35 -42	7.5	±	6.3	(5)	1.5	±	3.9	(5)
Days of recovery								
1 - 7	12.2	±	4.5	(5)	4.8	±	6.1	(5)
7 -14	7.2	±	5.0	(5)	13.8	±	4.2	(5)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
Values represent mean± S.D. (N)
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
* significantly different from control, $p<0.05$
** significantly different from control, $p<0.01$

Table 12-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Cumulative body weight gain of females, dams (g)

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Days of treatment				
1 -7	5.1 ± 8.6 (12)	3.7 ± 9.0 (12)	9.2 ± 6.6 (12)	9.8 ± 7.2 (12)
1 -14	16.2 ± 8.0 (12)	14.4 ± 7.6 (12)	21.0 ± 10.1 (12)	22.4 ± 6.7 (12)
Days of pregnancy				
0 - 7	41.5 ± 3.2 (11)	42.9 ± 10.3 (12)	38.8 ± 7.9 (12)	29.2 ± 12.4 (9)
0 -14	77.4 ± 4.7 (11)	83.0 ± 14.1 (12)	78.0 ± 10.7 (12)	61.9 ± 22.0 (9)
0 -20	154.8 ± 11.6 (11)	159.1 ± 21.5 (12)	158.2 ± 16.4 (12)	131.0 ± 32.8 (9)
Days of lactation				
0 - 4	31.0 ± 15.9 (12)	23.2 ± 19.9 (12)	35.5 ± 25.5 (12)	8.9 ± 23.9 (8)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 12-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Cumulative body weight gain of females, satellite groups (g)

Compound	TTC	
Dose (mg/kg)	0[a]	250
Days of treatment		
1 - 7	3.9 ± 12.4 (5)	14.8 ± 7.2 (5)
1 -14	19.5 ± 8.2 (5)	26.5 ± 13.6 (5)
1 -21	32.2 ± 12.3 (5)	32.1 ± 11.5 (5)
1 -28	42.0 ± 9.6 (5)	29.5 ± 14.4 (5)
1 -35	51.2 ± 13.3 (5)	28.2 ± 17.5 * (5)
1 -42	58.7 ± 15.9 (5)	29.7 ± 16.9 * (5)
Days of recovery		
1 - 7	12.2 ± 4.5 (5)	4.8 ± 6.1 (5)
1 -14	19.4 ± 2.2 (5)	18.6 ± 2.4 (5)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

* significantly different from control, $p<0.05$

Table 13

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Food consumption of males (g/day)

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Days of treatment				
1 - 2	27.7 ± 3.4 (12)	27.3 ± 3.0 (12)	26.9 ± 3.1 (12)	26.7 ± 2.3 (12)
7 - 8	27.7 ± 3.0 (12)	26.9 ± 2.1 (12)	27.6 ± 2.1 (12)	24.5 ± 2.9 * (11)
14 -15	27.7 ± 2.3 (12)	25.6 ± 3.0 (12)	27.3 ± 3.1 (12)	26.5 ± 3.8 (11)
29 -30	30.7 ± 2.3 (12)	29.1 ± 2.4 (12)	30.0 ± 2.7 (12)	26.1 ± 3.4 ** (11)
35 -36	29.5 ± 2.7 (12)	27.6 ± 2.4 (12)	28.3 ± 2.6 (12)	29.0 ± 2.9 (11)
41 -42	30.3 ± 3.6 (12)	30.3 ± 3.7 (12)	29.6 ± 2.7 (12)	28.8 ± 3.2 (11)
Days of recovery				
6 - 7	31.5 ± 2.9 (5)			29.8 ± 1.6 (5)
13 -14	28.6 ± 3.0 (5)			26.2 ± 2.6 (5)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

* significantly different from control, $p<0.05$

** significantly different from control, $p<0.01$

Table 14-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Food consumption of females, dams (g/day)

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Days of treatment				
1 - 2	19.4 ± 3.6 (12)	19.6 ± 2.9 (12)	20.2 ± 3.4 (12)	20.0 ± 2.2 (12)
7 - 8	19.2 ± 2.6 (12)	18.9 ± 3.2 (12)	19.2 ± 2.2 (12)	20.0 ± 2.2 (12)
14 -15	18.2 ± 3.7 (12)	18.5 ± 3.2 (12)	20.9 ± 1.8 (12)	20.2 ± 1.9 (12)
Days of pregnancy				
0 - 1	21.0 ± 2.8 (11)	21.1 ± 3.9 (12)	21.0 ± 2.6 (12)	21.0 ± 2.2 (9)
7 - 8	27.3 ± 3.5 (11)	26.7 ± 3.8 (12)	27.0 ± 3.7 (12)	27.0 ± 4.7 (9)
14 -15	27.3 ± 3.4 (11)	27.3 ± 3.5 (12)	26.7 ± 3.3 (12)	26.8 ± 4.2 (9)
20 -21	23.2 ± 4.0 (11)	24.3 ± 4.4 (12)	23.4 ± 5.6 (12)	30.1 ± 18.3 (9)
Days of lactation				
3 - 4	45.1 ± 7.6 (12)	43.8 ± 6.1 (12)	44.9 ± 7.0 (12)	37.9 ± 16.6 (8)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 14-2
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats
Food consumption of females, satellite groups (g/day)

Compound	TTC	
Dose (mg/kg)	0[a]	250
Days of treatment		
1 - 2	22.1 ± 1.6 (5)	18.2 ± 3.1 * (5)
7 - 8	19.3 ± 2.8 (5)	19.7 ± 3.7 (5)
14 -15	20.3 ± 2.5 (5)	19.6 ± 3.3 (5)
29 -30	23.2 ± 1.6 (5)	19.3 ± 7.1 (5)
35 -36	20.5 ± 0.7 (5)	19.6 ± 4.0 (5)
41 -42	21.3 ± 2.5 (5)	18.8 ± 2.8 (5)
Days of recovery		
6 - 7	21.8 ± 1.8 (5)	19.5 ± 2.9 (5)
13 -14	20.7 ± 1.4 (5)	19.7 ± 2.1 (5)

TTC:1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
Values represent mean±S.D. (N)
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
* significantly different from control, $p<0.05$

Table 15
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Findings in urinalysis of males

Compound		TTC			
Dose (mg/kg)		0[a]	62.5	125	250
On day 33 of treatment					
Number of animals examined		10	5	5	10
Quality					
Color	light yellow	10	5	5	10
Turbidity	negative	10	5	5	9
	trace	0	0	0	1
pH	7.0	0	0	0	1
	7.5	1	0	1	1
	8.0	7	4	1	5
	8.5	2	1	2	3
	≧9.0	0	0	1	0
Protein	negative	1	0	0	0
	trace	4	0	1	0
	30≦and <100 mg/dL	5	3	3	8
	100≦and <300 mg/dL	0	2	1	2
Glucose	negative	10	5	5	10
Ketone	negative	4	1	5	4
	trace	5	3	0	6
	slight	1	1	0	0
Bilirubin	negative	10	5	5	10
Occult blood	negative	9	5	5	9
	slight	1	0	0	1
Urobilinogen	0.1≦and <1.0 EU/dL	10	5	5	9
	1.0≦and <2.0 EU/dL	0	0	0	1
Urinary sediment					
Red blood cells	not observed	10	5	5	4
	1-9/3 visual field	0	0	0	2
	10-99/3 visual field	0	0	0	2
	100-299/3 visual field	0	0	0	1
	≧300/3 visual field	0	0	0	1
Crystal					
Grade	not observed	1	0	0	1
	a few	9	5	5	8
	abundant	0	0	0	1
Shape	phosphate-like	9	5	5	9

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a]vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5mL/kg)

Table 15 (Continued)
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Findings in urinalysis of males

Compound		TTC	
Dose (mg/kg)		0[a]	250
On day 13 of recovery			
Number of animals examined		5	5
Quality			
Color	light yellow	5	5
Turbidity	negative	5	5
pH	7.0	2	1
	7.5	2	1
	8.0	1	1
	8.5	0	0
	≧9.0	0	2
Protein	negative	0	0
	trace	0	0
	30≦and <100 mg/dL	3	3
	100≦and <300 mg/dL	2	2
Glucose	negative	5	5
Ketone	negative	0	0
	trace	2	2
	slight	3	3
Bilirubin	negative	5	5
Occult blood	negative	5	4
	slight	0	1
Urobilinogen	0.1≦and <1.0 EU/dL	4	4
	1.0≦and <2.0 EU/dL	1	1
Urinary sediment			
Red blood cells	not observed	5	3
	1-9/3 visual field	0	1
	10-99/3 visual field	0	0
	100-299/3 visual field	0	0
	≧300/3 visual field	0	1
Crystal			
Grade	a few	4	4
	abundant	1	1
Shape	phosphate-like	5	5

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a]vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5mL/kg)

Table 16 - 1
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Findings in urinalysis of females (collected on day 34 of treatment from mated females)

Compound		TTC			
Dose (mg/kg)		0[a]	62.5	125	250
On day 34 of treatment					
Number of animals examined		5	5	5	5
Quality					
Color	light yellow	5	5	5	5
Turbidity	negative	5	5	5	5
pH	6.0	0	0	1	0
	6.5	0	0	1	1
	7.0	0	3	2	3
	7.5	2	2	0	1
	8.0	1	0	1	0
	8.5	1	0	0	0
	≧9.0	1	0	0	0
Protein	negative	0	1	1	4
	trace	2	2	4	1
	30≦and <100 mg/dL	3	2	0	0
Glucose	negative	5	5	5	5
Ketone	negative	1	5	5	4
	trace	4	0	0	1
Bilirubin	negative	5	5	5	5
Occult blood	negative	5	5	5	5
Urobilinogen	0.1≦and <1.0 EU/dL	1	3	5	4
	1.0≦and <2.0 EU/dL	4	2	0	1
Urinary sediment					
Red blood cells	not observed	5	5	5	5
Crystal					
Grade	not observed	1	3	3	1
	a few	4	2	2	4
Shape	phosphate-like	4	2	2	4

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a]vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5mL/kg)

Table 16 - 2
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Findings in urinalysis of females (satellite group)

Compound		TTC	
Dose (mg/kg)		0[a]	250
<u>On day 34 of treatment</u>			
Number of animals examined		5	5
Quality			
Color	light yellow	5	5
Turbidity	negative	5	5
pH	5.5	0	0
	6.0	1	0
	6.5	0	1
	7.0	0	2
	7.5	1	1
	8.0	0	1
	8.5	2	0
	≧9.0	1	0
Protein	negative	2	1
	trace	1	1
	30≦and < 100 mg/dL	2	3
	100≦and < 300 mg/dL	0	0
Glucose	negative	5	5
Ketone	negative	3	5
	trace	2	0
Bilirubin	negative	5	5
Occult blood	negative	5	5
Urobilinogen	0.1≦and < 1.0 EU/dL	3	2
	1.0≦and < 2.0 EU/dL	2	3
Urinary sediment			
Red Blood cells	not observed	5	5
Crystal			
Grade	not observed	1	0
	a few	4	5
Shape	phosphate-like	4	5
Epithelial Cells	not observed	5	4
	a few	0	1

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a]vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5mL/kg)

Table 16 - 2 (Contiuned)
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Findings in urinalysis of females (satellite group)

Compound		TTC	
Dose (mg/kg)		0[a]	250
On day 13 of recovery			
Number of animals examined		5	5
Quality			
Color	light yellow	5	5
Turbidity	negative	5	5
pH	5.5	1	0
	6.0	1	1
	6.5	0	1
	7.0	1	1
	7.5	1	1
	8.0	1	0
	8.5	0	0
	≧9.0	0	1
Protein	negative	1	0
	trace	2	1
	30≦and < 100 mg/dL	2	2
	100≦and < 300 mg/dL	0	2
Glucose	negative	5	5
Ketone	negative	2	1
	trace	3	4
Bilirubin	negative	5	5
Occult blood	negative	5	5
Urobilinogen	0.1≦and < 1.0 EU/dL	2	1
	1.0≦and < 2.0 EU/dL	3	4
Urinary sediment			
Red Blood Cells	not observed	5	5
Crystal			
Grade	not observed	0	0
	a few	5	5
Shape	phosphate-like	5	5

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a]vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5mL/kg)

Table 17

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Hematological findings of males and females at the end of dosing period

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Male				
Number of animals	5	5	5	5
RBC ($\times 10^4/\mu$ L)	833 ± 43	822 ± 29	816 ± 38	777 ± 101
Hemoglobin (g/dL)	14.9 ± 0.6	14.5 ± 0.2	14.3 ± 0.5	13.2 ± 1.8
Hematocrit (%)	45.3 ± 1.1	44.0 ± 0.3	43.5 ± 1.5	40.8 ± 4.8 **
MCV (fL)	54.5 ± 2.5	53.6 ± 2.0	53.3 ± 1.4	52.7 ± 2.2
MCH (pg)	17.9 ± 0.9	17.7 ± 0.7	17.5 ± 0.3	16.9 ± 0.7
MCHC (g/dL)	32.9 ± 0.3	33.0 ± 0.4	32.8 ± 0.3	32.2 ± 0.8
Reticulocyte (%)	1.6 ± 0.5	2.0 ± 0.8	2.5 ± 0.5	4.9 ± 7.0
WBC ($\times 100/\mu$ L)	67.7 ± 21.9	64.5 ± 12.8	72.2 ± 20.7	59.8 ± 26.9
Differental leukocyte count (%)				
Neutrophil	20 ± 8	19 ± 4	19 ± 6	19 ± 10
Eosinophil	2 ± 0	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1
Basophil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Monocyte	6 ± 3	5 ± 2	5 ± 1	4 ± 2
Lymphocyte	72 ± 10	75 ± 6	76 ± 6	75 ± 10
Platelet ($\times 10^4/\mu$ L)	106.1 ± 16.4	107.0 ± 12.4	107.2 ± 9.1	112.3 ± 18.8
PT (sec)	18.1 ± 3.4	17.8 ± 1.0	16.6 ± 1.9	14.4 ± 1.7
APTT (sec)	23.9 ± 2.5	24.0 ± 2.0	23.2 ± 1.5	20.6 ± 2.1
Female, dam				
Number of animals	5	5	5	5
RBC ($\times 10^4/\mu$ L)	690 ± 24	680 ± 17	695 ± 25	652 ± 80
Hemoglobin (g/dL)	13.5 ± 0.3	13.4 ± 0.4	13.5 ± 0.4	12.9 ± 0.9
Hematocrit (%)	40.3 ± 0.6	40.3 ± 1.1	41.1 ± 1.4	38.4 ± 2.7
MCV (fL)	58.5 ± 1.2	59.3 ± 1.8	59.1 ± 1.0	59.3 ± 4.2
MCH (pg)	19.5 ± 0.6	19.6 ± 0.5	19.5 ± 0.4	20.0 ± 1.4
MCHC (g/dL)	33.4 ± 0.4	33.1 ± 0.3	32.9 ± 0.3	33.7 ± 0.3
Reticulocyte (%)	4.4 ± 1.7	6.0 ± 0.4	5.4 ± 1.8	6.7 ± 6.1
WBC ($\times 100/\mu$ L)	75.7 ± 29.3	79.2 ± 11.5	77.0 ± 28.4	83.6 ± 10.9
Differental leukocyte count (%)				
Neutrophil	19 ± 4	21 ± 5	23 ± 5	22 ± 6
Eosinophil	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 1
Basophil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Monocyte	8 ± 4	7 ± 2	7 ± 3	6 ± 1
Lymphocyte	72 ± 2	71 ± 5	69 ± 5	71 ± 6
Platelet ($\times 10^4/\mu$ L)	114.7 ± 20.9	113.1 ± 14.1	105.4 ± 18.7	123.5 ± 37.3
PT (sec)	12.5 ± 0.4	12.6 ± 0.4	12.4 ± 0.4	12.6 ± 0.5
APTT (sec)	18.4 ± 0.9	19.0 ± 1.3	18.1 ± 0.5	19.4 ± 1.6

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D.

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

** significantly different from control, $p<0.01$

Table 18

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Hematological findings of males and females at the end of recovery period

Compound	TTC		
Dose (mg/kg)	0[a]	250	
Male			
Number of animals	5	5	
RBC ($\times 10^4/\mu$ L)	838 ± 43	807 ± 73	
Hemoglobin (g/dL)	14.6 ± 0.4	14.7 ± 1.0	
Hematocrit (%)	44.1 ± 1.2	44.1 ± 3.2	
MCV (fL)	52.7 ± 1.5	54.8 ± 1.9	
MCH (pg)	17.4 ± 0.6	18.2 ± 0.8	
MCHC (g/dL)	33.1 ± 0.2	33.2 ± 0.4	
Reticulocyte (%)	2.5 ± 0.4	2.2 ± 1.0	
WBC ($\times 100/\mu$ L)	83.4 ± 17.0	70.3 ± 10.1	
Differental leukocyte count (%)			
Neutrophil	12 ± 5	11 ± 4	
Eosinophil	2 ± 1	1 ± 1	
Basophil	0 ± 0	0 ± 0	
Monocyte	4 ± 1	5 ± 2	
Lymphocyte	82 ± 6	83 ± 4	
Platelet ($\times 10^4/\mu$ L)	103.4 ± 21.7	106.0 ± 11.4	
PT (sec)	19.9 ± 3.8	19.3 ± 4.2	
APTT (sec)	23.9 ± 1.3	23.5 ± 2.7	
Female, satellite group			
Number of animals	5	5	
RBC ($\times 10^4/\mu$ L)	774 ± 27	765 ± 21	
Hemoglobin (g/dL)	14.4 ± 0.6	13.6 ± 0.2	*
Hematocrit (%)	43.2 ± 1.8	40.9 ± 0.9	*
MCV (fL)	55.9 ± 0.9	53.4 ± 0.7	**
MCH (pg)	18.6 ± 0.3	17.8 ± 0.4	**
MCHC (g/dL)	33.2 ± 0.3	33.3 ± 0.4	
Reticulocyte (%)	2.0 ± 0.5	2.2 ± 0.5	
WBC ($\times 100/\mu$ L)	37.2 ± 7.3	36.9 ± 9.0	
Differental leukocyte count (%)			
Neutrophil	14 ± 4	16 ± 6	
Eosinophil	2 ± 0	3 ± 1	
Basophil	0 ± 0	0 ± 0	
Monocyte	6 ± 3	7 ± 2	
Lymphocyte	78 ± 6	75 ± 9	
Platelet ($\times 10^4/\mu$ L)	92.0 ± 13.3	110.4 ± 14.8	
PT (sec)	11.9 ± 0.5	11.8 ± 0.7	
APTT (sec)	19.4 ± 0.9	20.2 ± 1.2	

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D.

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

* significantly different from control, $p<0.05$

** significantly different from control, $p<0.01$

Table 19

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Biochemical findings of males and females at the end of dosing period

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Male				
Number of animals	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.7 ± 0.2	5.4 ± 0.3	5.6 ± 0.2	5.6 ± 0.1
Albumin (g/dL)	3.7 ± 0.1	3.4 ± 0.2 *	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.1 *
A/G	1.77 ± 0.12	1.71 ± 0.17	1.78 ± 0.12	1.70 ± 0.10
Blood urea nitrogen (mg/dL)	19 ± 3	22 ± 2	20 ± 2	19 ± 4
Creatinine (mg/dL)	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1 *
Glucose (mg/dL)	159 ± 17	148 ± 17	147 ± 9	148 ± 14
Total cholesterol (mg/dL)	42 ± 13	34 ± 6	38 ± 7	36 ± 7
Triglyceride (mg/dL)	42 ± 16	21 ± 9	20 ± 2	25 ± 16
ALP (U/L)	198 ± 14	196 ± 31	196 ± 39	261 ± 228
ALT (U/L)	33 ± 2	32 ± 4	33 ± 5	31 ± 7
AST (U/L)	68 ± 10	68 ± 11	69 ± 8	71 ± 15
γ-GTP (U/L)	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 2	2 ± 0
Total bilirubin (mg/dL)	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02
Inorganic phosphorus (mg/dL)	6.4 ± 0.3	7.1 ± 0.7	6.8 ± 0.5	6.9 ± 0.2
Calcium (mg/dL)	9.4 ± 0.3	9.3 ± 0.3	9.3 ± 0.3	9.5 ± 0.3
Na (mEq/L)	142.1 ± 0.7	141.7 ± 1.0	142.0 ± 0.9	142.6 ± 1.3
K (mEq/L)	4.14 ± 0.25	4.28 ± 0.24	4.18 ± 0.21	4.27 ± 0.34
Cl (mEq/L)	105.9 ± 1.4	106.4 ± 1.0	106.3 ± 0.8	106.7 ± 1.9
Female, dam				
Number of animals	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.8 ± 0.2	5.8 ± 0.2	5.7 ± 0.2	5.6 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.7 ± 0.1	3.8 ± 0.0	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.3
A/G	1.80 ± 0.12	1.85 ± 0.17	1.84 ± 0.16	1.97 ± 0.17
Blood urea nitrogen (mg/dL)	20 ± 2	19 ± 5	18 ± 1	22 ± 5
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2
Glucose (mg/dL)	114 ± 3	122 ± 11	127 ± 10	118 ± 18
Total cholesterol (mg/dL)	49 ± 13	44 ± 6	42 ± 4	41 ± 12
Triglyceride (mg/dL)	20 ± 10	22 ± 5	28 ± 19	36 ± 15
ALP (U/L)	102 ± 43	84 ± 10	96 ± 17	87 ± 60
ALT (U/L)	39 ± 9	35 ± 3	33 ± 5	40 ± 8
AST (U/L)	76 ± 21	69 ± 7	64 ± 7	88 ± 32
γ-GTP (U/L)	2 ± 1	3 ± 1	2 ± 1	2 ± 1
Total bilirubin (mg/dL)	0.07 ± 0.04	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Inorganic phosphorus (mg/dL)	7.3 ± 0.5	7.2 ± 0.6	7.3 ± 0.7	7.1 ± 1.0
Calcium (mg/dL)	9.8 ± 0.2	10.0 ± 0.2	9.7 ± 0.2	9.6 ± 1.1
Na (mEq/L)	140.5 ± 1.4	141.0 ± 1.1	141.6 ± 0.8	140.7 ± 2.4
K (mEq/L)	4.25 ± 0.18	4.23 ± 0.35	4.16 ± 0.18	4.08 ± 0.44
Cl (mEq/L)	106.7 ± 1.3	106.8 ± 1.2	106.4 ± 2.0	105.5 ± 2.3

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D.

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

* significantly different from control, $p<0.05$

Table 20

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Biochemical findings of males and females at the end of recovery period

Compound	TTC		
Dose (mg/kg)	0[a]	250	
Male			
Number of animals	5	5	
Total protein (g/dL)	6.0 ± 0.3	5.7 ± 0.2	
Albumin (g/dL)	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.3	
A/G	1.62 ± 0.09	1.85 ± 0.27	
Blood urea nitrogen (mg/dL)	18 ± 3	15 ± 2	
Creatinine (mg/dL)	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	*
Glucose (mg/dL)	180 ± 35	158 ± 20	
Total cholesterol (mg/dL)	43 ± 9	46 ± 7	
Triglyceride (mg/dL)	32 ± 16	35 ± 15	
ALP (U/L)	177 ± 22	230 ± 81	
ALT (U/L)	31 ± 8	40 ± 17	
AST (U/L)	71 ± 14	81 ± 22	
γ -GTP (U/L)	1 ± 0	1 ± 0	
Total bilirubin (mg/dL)	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	
Inorganic phosphorus (mg/dL)	6.7 ± 0.7	6.5 ± 0.8	
Calcium (mg/dL)	9.4 ± 0.3	9.3 ± 0.1	
Na (mEq/L)	143.0 ± 1.3	143.4 ± 0.7	
K (mEq/L)	4.12 ± 0.37	4.00 ± 0.30	
Cl (mEq/L)	105.0 ± 2.0	105.2 ± 2.0	
Female, satellite group			
Number of animals	5	5	
Total protein (g/dL)	6.1 ± 0.3	6.5 ± 0.5	
Albumin (g/dL)	4.0 ± 0.2	4.4 ± 0.5	
A/G	1.95 ± 0.23	2.10 ± 0.23	
Blood urea nitrogen (mg/dL)	21 ± 3	18 ± 3	
Creatinine (mg/dL)	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	**
Glucose (mg/dL)	130 ± 31	148 ± 25	
Total cholesterol (mg/dL)	49 ± 6	60 ± 16	
Triglyceride (mg/dL)	16 ± 6	37 ± 12	**
ALP (U/L)	85 ± 14	91 ± 18	
ALT (U/L)	27 ± 7	28 ± 6	
AST (U/L)	78 ± 15	69 ± 15	
γ -GTP (U/L)	1 ± 1	1 ± 0	
Total bilirubin (mg/dL)	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.01	
Inorganic phosphorus (mg/dL)	4.3 ± 0.5	4.7 ± 0.7	
Calcium (mg/dL)	9.4 ± 0.2	9.9 ± 0.4	
Na (mEq/L)	141.3 ± 0.8	141.8 ± 0.8	
K (mEq/L)	3.96 ± 0.34	3.64 ± 0.29	
Cl (mEq/L)	106.5 ± 1.1	105.7 ± 1.0	

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D.

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

* significantly different from control, $p<0.05$

** significantly different from control, $p<0.01$

Table 21

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Absolute and relative organ weight of males and females at the end of dosing period

Compound		TTC			
Dose (mg/kg)		0[a]	62.5	125	250
Male					
Number of animals		5	5	5	5
Terminal body weight	(g)	486.1 ± 31.6	475.4 ± 25.6	466.7 ± 17.6	411.2 ± 42.2 **
Brain	(g)	2.07 ± 0.06	2.07 ± 0.07	2.04 ± 0.08	2.05 ± 0.10
	(g%)	0.43 ± 0.03	0.44 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.51 ± 0.05 **
Thymus	(mg)	328.4 ± 41.1	300.3 ± 95.5	285.7 ± 113.1	273.6 ± 46.3
	(mg%)	67.6 ± 7.2	62.9 ± 18.9	61.2 ± 24.2	67.0 ± 11.7
Heart	(g)	1.42 ± 0.13	1.30 ± 0.07	1.31 ± 0.12	1.38 ± 0.10
	(g%)	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.00	0.28 ± 0.02	0.34 ± 0.02 **
Liver	(g)	13.77 ± 2.39	13.01 ± 1.47	12.80 ± 1.23	13.10 ± 2.04
	(g%)	2.82 ± 0.34	2.73 ± 0.24	2.75 ± 0.24	3.17 ± 0.18
Kidneys	(g)	3.23 ± 0.38	3.28 ± 0.18	3.02 ± 0.18	3.40 ± 0.42
	(g%)	0.66 ± 0.08	0.69 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.83 ± 0.08 **
Spleen	(g)	0.85 ± 0.16	0.76 ± 0.07	0.76 ± 0.12	0.86 ± 0.14
	(g%)	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.21 ± 0.04
Adrenal glands	(mg)	56.2 ± 5.1	53.9 ± 4.3	54.4 ± 11.9	69.0 ± 11.0
	(mg%)	11.6 ± 1.0	11.3 ± 0.6	11.7 ± 2.5	16.9 ± 3.5 *
Testes	(g)	3.41 ± 0.31	3.39 ± 0.46	3.19 ± 0.41	3.32 ± 0.39
	(g%)	0.71 ± 0.09	0.72 ± 0.10	0.69 ± 0.11	0.82 ± 0.15
Epididymides	(g)	1.22 ± 0.06	1.19 ± 0.08	1.18 ± 0.11	1.20 ± 0.12
	(g%)	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.05
Female, dam					
Number of animals		5	5	5	5
Terminal body weight	(g)	295.6 ± 9.1	302.3 ± 22.7	305.5 ± 17.8	280.4 ± 29.6
Brain	(g)	1.90 ± 0.09	1.87 ± 0.06	1.90 ± 0.06	1.89 ± 0.03
	(g%)	0.64 ± 0.03	0.62 ± 0.05	0.62 ± 0.02	0.68 ± 0.08
Thymus	(mg)	267.4 ± 67.5	243.9 ± 29.0	230.9 ± 61.0	217.7 ± 126.8
	(mg%)	90.4 ± 22.8	81.5 ± 15.1	75.5 ± 19.0	74.8 ± 37.7
Heart	(g)	0.97 ± 0.10	0.99 ± 0.11	0.95 ± 0.12	0.92 ± 0.12
	(g%)	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.03
Liver	(g)	10.17 ± 0.59	10.53 ± 0.79	10.11 ± 0.67	10.71 ± 0.99
	(g%)	3.44 ± 0.12	3.49 ± 0.26	3.31 ± 0.21	3.86 ± 0.62
Kidneys	(g)	2.05 ± 0.22	2.20 ± 0.10	2.16 ± 0.24	2.12 ± 0.21
	(g%)	0.70 ± 0.06	0.73 ± 0.07	0.71 ± 0.07	0.76 ± 0.13
Spleen	(g)	0.79 ± 0.13	0.83 ± 0.15	0.73 ± 0.13	0.79 ± 0.26
	(g%)	0.27 ± 0.05	0.28 ± 0.05	0.24 ± 0.05	0.28 ± 0.08
Adrenal glands	(mg)	78.2 ± 16.6	78.8 ± 11.1	73.6 ± 5.4	87.1 ± 14.2
	(mg%)	26.5 ± 5.6	26.0 ± 2.6	24.2 ± 1.9	31.5 ± 6.5

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D.

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

* significantly different from control, $p<0.05$

** significantly different from control, $p<0.01$

Table 22

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Absolute and relative organ weight of males and females at the end of recovery period

Compound		TTC		
Dose (mg/kg)		0[a]	250	
Male				
Number of animals		5	5	
Terminal body weight	(g)	529.0 ± 21.5	414.2 ± 18.0	**
Brain	(g)	2.08 ± 0.07	1.99 ± 0.12	
	(g%)	0.39 ± 0.03	0.48 ± 0.04	**
Thymus	(mg)	269.7 ± 23.4	257.9 ± 77.6	
	(mg%)	50.9 ± 3.5	61.8 ± 16.0	
Heart	(g)	1.44 ± 0.09	1.35 ± 0.10	
	(g%)	0.27 ± 0.02	0.32 ± 0.02	**
Liver	(g)	13.66 ± 1.42	11.29 ± 0.47	*
	(g%)	2.58 ± 0.26	2.73 ± 0.04	
Kidneys	(g)	3.24 ± 0.23	2.88 ± 0.23	*
	(g%)	0.61 ± 0.06	0.69 ± 0.03	*
Spleen	(g)	0.70 ± 0.11	0.75 ± 0.10	
	(g%)	0.13 ± 0.03	0.18 ± 0.02	*
Adrenal glands	(mg)	54.3 ± 9.8	61.2 ± 10.0	
	(mg%)	10.3 ± 1.6	14.7 ± 1.9	**
Testes	(g)	3.60 ± 0.23	3.37 ± 0.23	
	(g%)	0.68 ± 0.06	0.81 ± 0.05	**
Epididymides	(g)	1.32 ± 0.14	1.25 ± 0.12	
	(g%)	0.25 ± 0.03	0.30 ± 0.02	*
Female, satellite group				
Number of animals		5	5	
Terminal body weight	(g)	290.6 ± 21.1	256.3 ± 24.7	*
Brain	(g)	1.90 ± 0.06	1.95 ± 0.08	
	(g%)	0.65 ± 0.04	0.77 ± 0.08	*
Thymus	(mg)	294.6 ± 16.0	207.4 ± 55.2	*
	(mg%)	101.9 ± 10.9	81.4 ± 22.9	
Heart	(g)	0.88 ± 0.06	0.90 ± 0.08	
	(g%)	0.30 ± 0.01	0.35 ± 0.02	**
Liver	(g)	7.40 ± 0.41	7.38 ± 0.41	
	(g%)	2.55 ± 0.12	2.89 ± 0.27	*
Kidneys	(g)	1.99 ± 0.12	1.85 ± 0.19	
	(g%)	0.69 ± 0.07	0.73 ± 0.11	
Spleen	(g)	0.51 ± 0.08	0.49 ± 0.07	
	(g%)	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.03	
Adrenal glands	(mg)	76.4 ± 10.4	76.1 ± 5.5	
	(mg%)	26.6 ± 5.2	29.8 ± 2.7	

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D.

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

*, significantly different from control, $p<0.05$

**, significantly different from control, $p<0.01$

Table 23
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Macroscopic findings of males at the end of dosing period

Dose (Group)	0[a] mg/kg (MX01-)		62.5 mg/kg (MX02-)		125 mg/kg (MX03-)		250 mg/kg (MX04-)	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Epididymis)	[7]		[12]		[12]		[6]	
Abscess, cauda, unilateral	7	0	12	0	12	0	5	1
Adhesion, with the scrotum, cauda, bilateral/unilateral	7	0	12	0	12	0	4	2
Area, yellow, unilateral	7	0	12	0	12	0	5	1
(Kidney)	[7]		[12]		[12]		[6]	
Enlargement	7	0	11	1	12	0	4	2
Rough surface, right side	7	0	12	0	12	0	5	1
(Liver)	[7]		[12]		[12]		[6]	
Spot, white	7	0	11	1	12	0	6	0
(Spleen)	[7]		[12]		[12]		[6]	
Small	7	0	12	0	12	0	5	1
(Tail)	[7]		[12]		[12]		[6]	
Nodule	7	0	12	0	12	0	4	2
Area, dark red, distal site, skin	7	0	12	0	12	0	4	2

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
-, Negative; +, Positive
[ ], Number of animals examined

Table 24
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Macroscopic findings of females at the end of dosing period

Dose (Group)	0[a] mg/kg (FB01-)		62.5 mg/kg (FB02-)		125 mg/kg (FB03-)		250 mg/kg (FB04-)	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Kidney)	[12]		[12]		[12]		[11]	
Cyst, left side	12	0	12	0	11	1	11	0
(Liver)	[12]		[12]		[12]		[11]	
Spot, white	12	0	12	0	11	1	11	0
(Spleen)	[12]		[12]		[12]		[11]	
Nodule, white	11	1	12	0	12	0	11	0
Small	12	0	12	0	12	0	10	1
(Stomach)	[12]		[12]		[12]		[11]	
Spot, black, mucosa, glandular stomach	12	0	12	0	11	1	10	1
Recessed area, mucosa, glandular stomach	12	0	12	0	12	0	10	1
(Auricle)	[12]		[12]		[12]		[11]	
Nodule	12	0	12	0	12	0	9	2
Spot, black, skin	12	0	12	0	12	0	9	2
(Skin)								
Alopecia, peritoneum	11	1	12	0	12	0	11	0
(Subcutis)	[12]		[12]		[12]		[11]	
Mass, around the vulva	12	0	12	0	11	1	11	0
(Thymus)	[12]		[12]		[12]		[11]	
Small	12	0	12	0	12	0	10	1

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
-, Negative; +, Positive
[ ], Number of animals examined

Table 25
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Macroscopic findings of males at the end of recovery period

Dose (Group)	0[a] mg/kg (MX01-)		250 mg/kg (MX04-)	
Grade	-	+	-	+
(Epididymis)	[5]		[5]	
Nodule, cauda, bilateral	5	0	4	1
Adhesion, with the scrotum, cauda, bilateral	5	0	4	1
(Auricle)	[5]		[5]	
Spot, black, skin	5	0	4	1
(Scrotum)				
Nodule, skin	5	0	4	1

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
-, Negative; +, Positive
[ ], Number of animals examined

Table 26

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Macroscopic findings of females at the end of recovery period

Dose (Group)	0[a] mg/kg (FB05-)		250 mg/kg (FB06-)	
Grade	-	+	-	+
(Skin)	[5]		[5]	
Alopecia, in the clavicular area	5	0	4	1

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

-, Negative; +, Positive

[ ], Number of animals examined

Table 27

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Histopathological findings of males at the end of dosing period

Dose (Group)	0[a] mg/kg (MX01-)						62.5 mg/kg (MX02-)						125 mg/kg (MX03-)						250 mg/kg (MX04-)					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Testis)	[7]						[12]						[12]						[6]					
Atrophy, seminiferous tubule, focal	6	1	0	0	0	1	9	2	1	0	0	3	11	0	1	0	0	1	4	1	1	0	0	2
(Epididymis)	[7]						[12]						[12]						[6]					
Cell debris, lumen	7	0	0	0	0	0	9	2	1	0	0	3	9	2	1	0	0	3	2	4	0	0	0	4 #
Spermatic granuloma	7	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	11	1	0	0	0	1	4	1	0	1	0	2
Cellular infiltration, lymphocyte, & macrophage, interstitium	7	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	11	1	0	0	0	1	2	3	1	0	0	4 #
Fibrosis, tunica albuginea, focal, with proliferation of capillary	7	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	11	1	0	0	0	1	2	1	3	0	0	4 #
Attachment, sperm/cell debris/ fibrin/ macrophage, on tunica albuginea	7	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	2	3	1	0	0	4 #
(Kidney)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Eosinophilic body	1	3	0	1	0	4	5	0	0	0	0	0 #	3	1	1	0	0	2	5	0	0	0	0	0 #
Basophilic tubule, cortex	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4	2	3	0	0	0	3
Cellular infiltration, interstitium, cortex	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	0	1	0	0	1	4	1	0	0	0	1
Deposit, pigment, brown, proximal tubule, cortex	5	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0 **	5 ##	0	0	1	4	0 **	5 ##	0	1	4	0	0 **	5 ##
Mineralization, focal, cortex	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0
Cast, hyaline, cortex	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Necrosis, papilla	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	1
Edema, papilla	5	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	4 #	0	5	0	0	0 **	5 ##	0	4	0	1	0 **	5 ##
Basophilic tubule, papilla	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	1	0	1	0	2
Mineralization, focal, papilla	4	1	0	0	0	1	1	4	0	0	0	4	1	3	1	0	0	4	3	1	0	1	0	2
Cellular infiltration, neutrophil, papilla	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	0	0	1	0	1
Cyst, focal, cortico-medullary junction	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, neutrophil & lymphocyte, renal pelvis & transitional epithelium	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
Hyperplasia, transitional epithelium, focal, renal pelvis	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
(Adrenal gland)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Hypertrophy, fascicular cell, diffuse	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	0	4	1	0	0 **	5 ##	0	0	4	1	0 **	5 ##
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Fatty change, hepatocyte, periportal	0	4	1	0	0	5	0	4	1	0	0	5	0	4	1	0	0	5	0	5	0	0	0	5
Microgranuloma	1	4	0	0	0	4	0	4	1	0	0	5	0	3	2	0	0	5	0	1	4	0	0 *	5
Single cell necrosis, centrilobular	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1
Fibrosis, focal, with mineralization, caudal lobule	5	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0

(continued)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade; [ ], Number of animals examined

*,**, Significantly different from control $p<0.01$, $p<0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

#, ##, Significantly different from control $p<0.01$, $p<0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 27 (Continued-1)
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Histopathological findings of males at the end of dosing period

Dose (Group)	0[a] mg/kg (MX01-)						62.5 mg/kg (MX02-)						125 mg/kg (MX03-)						250 mg/kg (MX04-)					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Brain)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Spinal cord)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Pituitary gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Heart)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Degeneration/fibrosis, myocardium, focal	3	2	0	0	0	2													4	1	0	0	0	1
(Lung & Bronchus)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Accumulation, foam cell, focal, alveolus	5	0	0	0	0	0													4	1	0	0	0	1
Mineralization, arterial wall, lung	3	2	0	0	0	2													5	0	0	0	0	0
Metaplasia, osseous, focal, alveolus	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0
Fibrosis, artery, pulmonary, focal	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0
(Trachea)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Thymus)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Mandibular lymph node)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Stomach)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Duodenum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Jejunum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Ileum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Cecum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Colon)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Rectum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								

(continued)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade; [ ], Number of animals examined

Table 27 (Continued-2)
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Histopathological findings of males at the end of dosing period

Dose (Group)	0[a] mg/kg (MX01-)						62.5 mg/kg (MX02-)						125 mg/kg (MX03-)						250 mg/kg (MX04-)					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Mesenteric lymph node)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Spleen)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	0	4	1	0	5													0	0	2	3	0	5
Deposit, pigment, brown	0	0	3	2	0	5													0	0	4	1	0	5
(Urinary bladder)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Prostate)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Cellular infiltration, lymphocyte & neutrophil, epithelium/interstitium	0	2	2	1	0	5													2	1	2	0	0	3
(Seminal vesicle & Coagulating gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Sciatic nerve)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Bone marrow of Femur)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Scrotum)	[0]						[0]						[0]						[2]					
Granulation tissue, subcutis with multinucleated giant cell																			0	0	1	0	1	2
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage, subcutis																			1	0	0	0	1	1
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage, muscular layer & tunica vaginalis																			1	0	0	0	1	1
(Tail at the proximal site)	[0]						[0]						[0]						[2]					
Granulation tissue, subcutis, with multinucleated giant cell																			1	0	1	0	0	1
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage, & lymphocyte, corium																			1	1	0	0	0	1
Thrombus, artery, subcutis																			1	1	0	0	0	1
(Tail at the distal site)	[0]						[0]						[0]						[2]					
Granulation tissue, subcutis, with multinucleated giant cell																			0	0	2	0	0	2
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage, & lymphocyte, subcutis																			0	0	0	0	2	2
Hemorrhage, with deposit of brown pigment, corium/subcutis																			0	0	1	0	1	2
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage, & lymphocyte, corium																			0	0	2	0	0	2
Attachment, crust																			0	0	0	0	2	2

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade; [ ], Number of animals examined

Table 28

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Histopathological findings of females at the end of dosing period

Dose (Group)	0[a] mg/kg (FB01-)						62.5 mg/kg (FB02-)						125 mg/kg (FB03-)						250 mg/kg (FB04-)					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Ovary)	[12]						[12]						[12]						[11]					
No remarkable change																								
(Kidney)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Basophilic tubule, cortex	3	2	0	0	0	2	2	3	0	0	0	3	4	0	0	1	0	1	3	1	0	0	1	2
Mineralization, focal, papilla	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Necrosis, proximal tubule, cortex	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Vacuolization, proximal tubule, cortex	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	1	0	1	0	2
Cast, hyaline, cortex/medulla	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
Deposit, pigment, brown, proximal tubule, cortex	5	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0 **	5 ##	0	1	4	0	0 **	5 ##	0	5	0	0	0 **	5 ##
Cyst, focal, cortex	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	1	5	0	0	0	0	0
Edema, papilla	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
Cellular infiltration, interstitium, papilla	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Dilatation, lumen, distal tubule, cortex	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	1
Hyperplasia, transitional epithelium, focal, renal pelvis	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
(Adrenal gland)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Hypertrophy, fascicular cell, diffuse	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	1	3	1	0	0	4 #
(Liver)	[5]						[5]						[6]						[5]					
Fatty change, hepatocyte, periportal	1	4	0	0	0	4	0	5	0	0	0	5	0	6	0	0	0	6	2	3	0	0	0	3
Microgranuloma	3	2	0	0	0	2	2	3	0	0	0	3	5	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2
Hyperplasia, bile duct	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
Hematopoiesis, extramedullary	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	1	0	0	1	4	1	0	0	0	1
Hyperplasia, Kupffer cell, diffuse	5	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	1	6	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Vacuolization, hepatocyte, midlobular	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Necrosis/fibrosis, focal, subcapsule	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2	5	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0
(Brain)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Spinal cord)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								

(continued)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade; [ ], Number of animals examined

**, Significantly different from control $p<0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

#, ##, Significantly different from control $p<0.01$, $p<0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 28 (Continued-1)
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Histopathological findings of females at the end of dosing period

Dose (Group)	0[a] mg/kg (FB01-)						62.5 mg/kg (FB02-)						125 mg/kg (FB03-)						250 mg/kg (FB04-)					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Pituitary gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Dilatation, Rathke's cleft	4	0	1	0	0	1													4	1	0	0	0	1
(Heart)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Lung & Bronchus)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Accumulation, foam cell, focal, alveolus	3	2	0	0	0	2													3	2	0	0	0	2
Mineralization, arterial wall, lung	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0
Congestion	5	0	0	0	0	0													5	0	0	0	0	0
(Trachea)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Thymus)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Atrophy	5	0	0	0	0	0													4	0	0	0	1	1
(Mandibular lymph node)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Stomach)	[5]						[0]						[1]						[5]					
Erosion, mucosa, glandular stomach	5	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	1
Edema, lamina propria, glandular stomach	5	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	1
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage, lamina propria, glandular stomach	5	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	1
(Duodenum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Jejunum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Ileum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Cecum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Colon)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Rectum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								

(continued)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade; [ ], Number of animals examined

Table 28 (Continued-2)
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Histopathological findings of females at the end of dosing period

Dose (Group)	0[a] mg/kg (FB01-)						62.5 mg/kg (FB02-)						125 mg/kg (FB03-)						250 mg/kg (FB04-)					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Mesenteric lymph node)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Spleen)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	0	2	3	0	5													0	0	1	3	1	5
Deposit, pigment, brown	0	0	2	3	0	5													0	0	1	4	0	5
Decrease, area, red pulp	5	0	0	0	0	0													4	0	0	1	0	1
Necrosis, focal, with hemorrhage & cellular infiltration of neutrophil	4	0	1	0	0	1													5	0	0	0	0	0
(Urinary bladder)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Uterus)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Vagina)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Sciatic nerve)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Bone marrow of Femur)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Auricle)	[0]						[0]						[0]						[3]					
Granulation tissue, subcutis, with multinucleated giant cell																			0	1	0	2	0	3
Degeneration, muscular layer, focal, subcutis																			1	0	2	0	0	2
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage, & lymphocyte, corium & subcutis																			0	1	2	0	0	3
Cellular infiltration, neutrophil & lymphocyte, epidermis																			2	0	1	0	0	1
Attachment, crust, epidermis																			2	1	0	0	0	1
(Subcutis of vulva)	[0]						[0]						[1]						[0]					
Adenoma, mammary gland													tumor = 1											

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade; [ ], Number of animals examined

Table 29
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Histopathological findings of males at the end of recovery period

Dose (Group)		0[a] mg/kg (MX01-)							250 mg/kg (MX04-)						
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.	
(Testis)	[5]							[5]							
Atrophy, seminiferous tubule, focal		5	0	0	0	0	0		4	1	0	0	0	1	
(Epididymis)	[5]							[5]							
Cell debris, lumen		4	1	0	0	0	1		3	1	1	0	0	2	
Spermatic granuloma		5	0	0	0	0	0		4	0	0	1	0	1	
Cellular infiltration, lymphocyte, & macrophage, interstitium		5	0	0	0	0	0		4	0	0	1	0	1	
Fibrosis, tunica albuginea, focal, with proliferation of capillary		5	0	0	0	0	0		2	2	0	1	0	3	
Attachment, sperm/cell debris/ fibrine/ macrophage, on tunica albuginea		5	0	0	0	0	0		2	2	0	1	0	3	
(Kidney)	[5]							[5]							
Eosinophilic body		3	1	1	0	0	2		5	0	0	0	0	0	
Basophilic tubule, cortex		2	3	0	0	0	3		0	4	1	0	0	5	
Deposit, pigment, brown, proximal tubule, cortex		5	0	0	0	0	0		0	0	2	3	0 **	5	##
Fibrosis, focal, subcapsule		5	0	0	0	0	0		4	1	0	0	0	1	
Necrosis, papilla		5	0	0	0	0	0		2	1	2	0	0	3	
Edema, papilla		5	0	0	0	0	0		2	1	2	0	0	3	
Mineralization, focal, papilla		4	1	0	0	0	1		5	0	0	0	0	0	
(Adrenal gland)	[5]							[5]							
Hypertrophy, fascicular cell, diffuse		5	0	0	0	0	0		0	4	1	0	0 **	5	##
(Liver)	[5]							[5]							
Fatty change, hepatocyte, periportal		0	3	2	0	0	5		0	5	0	0	0	5	
Microgranuloma		0	4	1	0	0	5		0	2	3	0	0	5	
Single cell necrosis, centrilobular		3	2	0	0	0	2		3	2	0	0	0	2	
(Scrotum)	[0]							[1]							
Granulation tissue, subcutis with multinucleated giant cell									0	0	1	0	0	1	
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage, subcutis									0	1	0	0	0	1	
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage, muscular layer & tunica vaginalis									0	1	0	0	0	1	
(Auricle)	[0]							[1]							
Granulation tissue, subcutis									0	1	0	0	0	1	
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage, & lymphocyte, subcutis epidermis									0	0	1	0	0	1	
Attachment, crust									0	0	1	0	0	1	

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)
-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade; [ ], Number of animals examined
**, Significantly different from control $p<0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)
##, Significantly different from control $p<0.01$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 30
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats
Histological findings of females at the end of recovery period

Dose (Group)		0[a] mg/kg (FB05-)							250 mg/kg (FB06-)						
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.			-	±	+	++	+++	Pos.
(Ovary)	[5]								[5]						
Decrease, corpus luteum		5	0	0	0	0	0			4	0	0	1	0	1
(Kidney)	[5]								[5]						
Basophilic tubule, cortex		4	1	0	0	0	1			0	5	0	0	0	5 #
Deposit, pigment, brown, proximal tubule, cortex		5	0	0	0	0	0			0	3	2	0	0 **	5 ##
Edema, papilla		5	0	0	0	0	0			0	5	0	0	0 **	5 ##
(Adrenal gland)	[5]								[5]						
No remarkable change															
(Liver)	[5]								[5]						
Fatty change, hepatocyte, periportal		0	5	0	0	0	5			0	5	0	0	0	5
Microgranuloma		2	3	0	0	0	3			1	4	0	0	0	4

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade; [ ], Number of animals examined

**, Significantly different from control $p<0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

#, ##, Significantly different from control $p<0.01$, $p<0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 31

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Estrous cycle of dams

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Number of dams examined	12	12	12	12
Pre-treatment period				
Number of animals showing type of cycle				
4-day cycle	12	12	12	12
Treatment period				
Number of animals showing each type of cycle				
4-day cycle	12	12	11	10
4/5-day cycle	0	0	1	1
long cycle	0	0	0	1
Frequency of animals of which type of estrus cycle was changed after the treatment	0 / 12	0 / 12	1 / 12	1 / 12
Mean times of vaginal estrus during meating period; mean±S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (11)	1.0 ± 0.0 (12)	1.0 ± 0.0 (12)	1.0 ± 0.0 (12)

TTC, 1,3,5-Triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 32

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Reproductive performance of animals

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Number of pairs examined	12	12	12	12
Number of pairs copulated	12	12	12	12
Copulation index	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	12	12	12	9
Fertility index	100.0	100.0	100.0	75.0
Pairing days until copulation; mean±S.D.	2.4 ± 1.1	2.4 ± 1.2	2.0 ± 1.0	2.3 ± 1.3

TTC, 1,3,5-Triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Copulation index = (number of pairs copulated / number of pairs examined) × 100, %

Fertility index = (number of pregnant females / number of pairs copulated) × 100, %

Table 33

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Development of pups up to day 4 of lactation

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Number of pregnant females	12	12	12	9
Number of pregnant females with live newborns	12	12	12	9
Gestation index	100	100	100	100
Gestation length in days	22.2 ± 0.4 (11)	22.3 ± 0.5 (12)	22.5 ± 0.5 (12)	22.7 ± 0.5 (9)
Number of corpora lutea	15.9 ± 1.6 (12)	15.1 ± 2.2 (12)	15.7 ± 1.3 (12)	13.7 ± 2.3 * (9)
Number of implantations	15.4 ± 1.9 (12)	14.2 ± 2.0 (12)	15.3 ± 1.2 (12)	12.8 ± 3.6 (9)
Implantation index	96.7 ± 5.2 (12)	94.2 ± 5.1 (12)	97.5 ± 5.3 (12)	92.0 ± 19.7 (9)
Day 0 of lactation (at birth)				
Number of newborns	14.1 ± 2.0 (12)	13.5 ± 1.8 (12)	13.8 ± 1.6 (12)	12.0 ± 3.4 (9)
Delivery index	91.5 ± 7.7 (12)	95.6 ± 5.1 (12)	90.3 ± 9.2 (12)	94.5 ± 5.7 (9)
Number of live newborns	13.9 ± 1.9 (12)	13.3 ± 1.9 (12)	13.5 ± 2.2 (12)	11.9 ± 3.3 (9)
Males	7.8 ± 2.0 (12)	6.8 ± 2.7 (12)	6.8 ± 2.1 (12)	4.8 ± 1.7 ** (9)
Females	6.1 ± 2.5 (12)	6.5 ± 2.7 (12)	6.8 ± 2.4 (12)	7.1 ± 3.0 (9)
Birth index	90.4 ± 7.3 (12)	94.3 ± 4.7 (12)	88.7 ± 13.4 (12)	93.7 ± 5.3 (9)
Live birth index	98.9 ± 2.6 (12)	98.8 ± 2.9 (12)	97.7 ± 7.9 (12)	99.2 ± 2.4 (9)
Sex ratio on day 0	56.8 ± 14.9 (12)	51.2 ± 18.3 (12)	50.5 ± 14.2 (12)	44.4 ± 23.2 (9)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	13.8 ± 1.9 (12)	13.3 ± 1.9 (12)	13.5 ± 2.2 (12)	11.5 ± 3.3 (8)
Males	7.7 ± 2.1 (12)	6.8 ± 2.7 (12)	6.8 ± 2.1 (12)	5.0 ± 1.2 (8)
Females	6.1 ± 2.5 (12)	6.5 ± 2.7 (12)	6.8 ± 2.4 (12)	6.5 ± 2.8 (8)
Viability index	98.9 ± 2.7 (12)	100.0 ± 0.0 (12)	100.0 ± 0.0 (12)	98.3 ± 4.7 (8)
Sex ratio on day 4	56.2 ± 15.1 (12)	51.2 ± 18.3 (12)	50.5 ± 14.2 (12)	48.1 ± 22.0 (8)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

* significantly different from control, $p<0.05$

** significantly different from control, $p<0.01$

Gestation index = (number of pregnant females with live newborns / number of pregnant females) × 100, %

Implantation index = (number of implantations / number of corpora lutea) × 100, %

Delivery index = (number of newborns / number of implantations) × 100, %

Birth index = (number of live newborns / number of implantations) × 100, %

Live birth index = (number of live newborns / number of newborns) × 100, %

Sex ratio on day 0 = (number of male live newborns / number of live newborns) × 100, %

Viability index = (number of live pups on day 4 of lactation / number of live newborns) × 100, %

Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 of lactation / number of live pups on day 4 of lactation) × 100, %

Table 34

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administation in rats

Mean body weight of pups up to day 4 of lactation

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Day 0 of lactation				
Number of live newborns				
Male	7.8 ± 2.0 (12)	6.8 ± 2.7 (12)	6.8 ± 2.1 (12)	4.8 ± 1.7 ** (9)
Female	6.1 ± 2.5 (12)	6.5 ± 2.7 (12)	6.8 ± 2.4 (12)	7.1 ± 3.0 (9)
Mean body weight (g)				
Male	6.7 ± 0.3 (12)	7.1 ± 0.8 (12)	7.1 ± 0.5 (12)	7.3 ± 0.7 (9)
Female	6.3 ± 0.3 (12)	6.7 ± 0.7 (12)	6.7 ± 0.5 (12)	6.8 ± 0.6 (8)
Day 4 of lactation				
Number of live newborns				
Male	7.7 ± 2.1 (12)	6.8 ± 2.7 (12)	6.8 ± 2.1 (12)	5.0 ± 1.2 (8)
Female	6.1 ± 2.5 (12)	6.5 ± 2.7 (12)	6.8 ± 2.4 (12)	6.5 ± 2.8 (8)
Mean body weight (g)				
Male	11.0 ± 0.9 (12)	11.7 ± 1.3 (12)	11.2 ± 1.1 (12)	12.1 ± 2.4 (8)
Female	10.4 ± 0.7 (12)	11.0 ± 1.2 (12)	10.6 ± 1.0 (12)	11.2 ± 2.0 (7)

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

Values represent mean±S.D. (N)

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

** significantly different from control, $p<0.01$

Table 35

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TTC by oral administration in rats

Morphological observations of pups

Compound	TTC			
Dose (mg/kg)	0[a]	62.5	125	250
Dead pups				
Number of dead pups[b]	4	2	3	3
Number of missing pups	1	0	0	2
Number of dead pups examined	3	2	3	1
No. of dead pups with external changes	0	0	0	0
No. of dead pups with visceral changes	0	0	0	0
Live pups				
Number of newborns examined (Day 0 of lactation; at birth)	167	160	162	107
No. of newborns with external changes	0	0	0	0
Number of pups examined (Day 4 of lactation; at necropsy)	165	160	162	92
No. of pups with external changes	0	0	0	0
No. of pups with visceral changes	0	0	0	0

TTC, 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione

[a] vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

[b] including missing pups