ペンタエリスリトールテトライソオクチレートの 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	糸	J · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	1
試懸	食目]的·····	2
方	法	<u> </u>	3
1	l .	被験物質・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	3
2	2.	使用動物および飼育方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	3
3	3.	投与検体の調製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	4
4	1.	投与量の設定および投与方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	5
5	5.	観察および検査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	6
6	3.	データ解析法・・・・・・・・・・・1	1
結	耒	₹1	4
I	• ,	反復投与毒性および回復性試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1	4
1	Ι.	一般状態1	4
2	2.	詳細な症状観察・・・・・・・・・・・・・・・・・・1	4
3	3.	機能検査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	4
4	4.	体重1	4
5	5.	摂餌量······ 1	4
6	3.	血液学検査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	5
7	7.	血液生化学検査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1	5
8	3.	病理学検査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	5
II		生殖発生毒性	7
]	1.	性周期および交配成績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1	7
2	2.	分娩および哺育所見・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	7
3	3.	黄体数および着床数・・・・・・・1	7
	4.	出生児所見・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	8
考	雾	······································	9
文	南		1

Figures $1\sim6$

Tables 1∼33

ペンタエリスリトールテトライソオクチレート(以下、PETE と略記)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)、100、300 および 1000 mg/kg の PETE を雌雄の 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、 雄は交配期間終了後 2 週間経過後に剖検した。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 1000 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 1000 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

死亡動物はいずれの群においてもみられなかった。投与期間中の一般状態、体重推移および 摂餌量に PETE 投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

投与期間終了時および14日間の休薬時の血液学検査、血液生化学検査、器官重量および病理 検査にも、PETE 投与による影響と断定できる変化は認められなかった。

詳細な症状観察および機能検査でも異常は認められず、神経毒性を示唆する所見はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

生殖発生毒性に関しては、性周期、交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、分娩率に PETE 投与の影響は認められなかった。出生児の観察については、生存、性比および体重に PETE 投与の影響は認められなかった。また、PETE 投与に起因したと考えられる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PETEの無作用量は、反復投与毒性および生殖発生毒性のいずれに関しても、PETE 投与に起因した影響が認められなかったことから、1000 mg/kg/dayと判断された。

【試 験 目 的】

ペンタエリスリトールテトライソオクチレート(商品名 NS-408)は、比重が大きく乳化安定性に優れたエステル油剤であり、化粧品などに使用されている。

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、ペンタエリスリトール テトライソオクチレート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。

本試験は、「OECD 化学物質試験法ガイドライン/反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験法」 (1996年3月22日) に準拠し、「化学物質 GLP」(平成12年3月1日改正、環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号)、「動物の愛護および管理に関する法律」(平成11年12月22日改正、法律第221号) および「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日、平成14年5月28日一部改正、総理府告示第6号) を遵守して実施した。

1. 被験物質

被験物質として用いたペンタエリスリトールテトライソオクチレート(以下、PETEと略記)の性状は、以下の通りである。

化学名

ペンタエリスリトールテトライソオクチレート

商品名

NS-408

英 名

Hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-

1,3-propanedivl ester

CAS No.

7299-99-2

分子式

 $C_{37}H_{68}O_8$

分子量

640. 93

物理化学的性質

性 状 : 無色透明液体

沸点

170°C (1 mmHg)

比 重:

0.96 (30/30℃)

構造式

本試験には、

から提供されたPETE「

含量 96.4%(GC)、

Appendix A] を用いた。被験物質は受領後(被験物質受領日:2003年12月25日)使用時まで、被験物質受領保管室において遮光下室温保管した。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を実施し、試験期間中、安定であったことを確認した(Appendix B)。

2. 使用動物および飼育方法

8 週齢の Sprague-Dawley(SD)系[Crj:CD(SD)IGS、SPF] の雌雄ラットを、日本チャールス・リバー株式会社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、全例の一般状態に異常は認められなかった。また、4日間隔以外の性周期を示した動物が16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4例、眼球突出が雌3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、雄全例、雌25例は殺処分し、雌10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: 2004年4月7日 入荷匹数: 雄57匹、雌93匹

入荷時体重: 雄 230.9~261.9 g (平均 245.6 g)、雌 168.3~197.1 g (平均 184.3 g)

投与開始日: 2004年4月22日

投与時体重: 雄 330.8~420.4 g (平均 374.0 g)、雌 207.2~245.0 g (平均 228.3 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計画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計画番号、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(9 号室)で、固型飼料(CE-2、日本クレア株式会社)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(腟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(哺育0日=分娩日)まで紙パルプ製チップ(ペパークリーン、日本エスエルシー株式会社)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 23.0~24.5℃、49.0~67.0%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

被験物質を秤量して媒体を加え、50 w/v%に調製した。これを媒体で段階希釈して 15 および

5 w/v%溶液を調製した。被験物質が水に不溶で、油に溶解するため、媒体は corn oil (ロット番号 V2P1825、製造元:ナカライテスク株式会社)を選択した。投与検体は遮光下室温に保管した。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%)
100	5
300	15
1000	50

投与に先立ち、被験物質の50および5w/v%溶液について、秦野研究所で遮光下室温における調製後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、2004年4月20日に調製した各濃度の調製検体中の被験物質含量を測定し、平均含量が調製指示濃度の107~110%であり、規定範囲内にあったことを確認した(Appendix D)。なお、投与検体は溶液のため均一性試験は実施しなかった。

調製検体中の被験物質濃度の測定は、各調製検体を $0.5\,\text{mL}$ ずつ採取し、ヘキサンで一定量とした後、ヘキサン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、ヘキサンに溶解して標準溶液(5、10、 $20\,\mu\text{g/mL}$)を調製した。試料溶液および標準溶液をガスクロマトグラフ(GC)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。GC条件を以下に示す。

分析カラム: DB-1

(内径 0.53 mm、長さ 15 m、膜厚 1.5 μm、J&W Scientific)

昇 温 条 件 : 250℃ (1分間) →5℃/分→300℃→15℃/分→315℃ (15分間)

キャリアーガス : ヘリウム (25 kPa)

水 素 : 60 kPa 空 気 : 50 kPa 注入口温度 : 280℃ 検出器温度 : 280℃

試 料 注 入 量 : 2 LL (スプリットレス、サンプリングタイム 0.25 分間)

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 PETE の反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合予備試験(試験計画番号: R-03-006) の結果から設定した。すなわち、雌雄ラットに 100、300 および 1000 mg/kg の PETE を 14 日間反復経口投与した結果、いずれの投与群においても、一般状態、体重推移およ

び器官重量(肝臓、腎臓および脾臓)に被験物質投与の影響が認められなかったことから、本試験における高用量群の投与量を限度量の1000 mg/kgに設定し、以下、公比約3で除して中用量を300 mg/kg、低用量を100 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(42~54日間)、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	濃度	投与容量*	動物番号			
		(mg/kg)	(w/v%)	(mL/kg)	雄	雌		
1	Corn oil (媒体)	0	0	2	MX01001~012	FB01001~012		
2	PETE	100	5	2	$MX02001 \sim 012$	FB02001~012		
3	PETE	300	15	2	$MX03001 \sim 012$	FB03001~012		
4	PETE	1000	50	2	MX04001~012	FB04001~012		
5 (サテライト群)	Corn oil (媒体)	0	0	2		FB05001~005		
6(サテライト群)	РЕТЕ	1000	50	2		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 (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. 観察および検査

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、 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。

5) 摂餌量測定

雄および雌のサテライト群は、投与 $1\sim2$ 、 $7\sim8$ 、 $14\sim15$ 、 $29\sim30$ 、 $35\sim36$ および $41\sim42$ 日、回復 $6\sim7$ および $13\sim14$ 日に、交配前の雌は、投与 $1\sim2$ 、 $7\sim8$ および $14\sim15$ 日、交尾確認後は妊娠 $9\sim1$ 、 $7\sim8$ 、 $14\sim15$ および $20\sim21$ 日、分娩後は哺育 $3\sim4$ 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) 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、腟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。

7) 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、腟スメア中の精子の存在あるいは腟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。

8) 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。

9) F、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。

10) 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 18~24 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手順で行い、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い、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)

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。

11) 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

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(ダイナボット)
白血球数 (WBC)	フローサイトメトリー・	同上
	レーザー光散乱法/電気抵抗法	
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	計算(Hb×1000/RBC)	
(MCH)		
平均赤血球血色素濃度	計算(Hb×100/Ht)	
(MCHC)	<u> </u>	

項目	測定法	使用機器
プロトロンビン時間(PT)	光散乱検出法	全自動血液凝固測定装置 CA-1000 (東亜医用電子)
活性部分トロンホ゛プ ラスチン時間(APTT)	同上	同上

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、観察は行わなかった。また、網状赤血球比率について も、標本は作製したが、赤血球系の検査において被験物質の影響が示唆されなかったことから、 観察は実施しなかった。

12) 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	ビウレット法	生化学自動分析装 COBAS MIRA plus (ロシュ・ダイアグノスティックス)
アルブミン濃度	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゛ーセ゛・HDAOS 法	同上
グルコース濃度	ヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法	同上
尿素窒素濃度	ウレアーゼ・G1DH 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゛(ALP) 活性	GSCC 法	同上
アスパ。ラキ、ン酸アミノトランスフェラーセ、	IFCC 法	同上
AST (GOT) 活性		
アラニンアミノトランスフェラーセ゛	同上	同上
ALT (GPT) 活性		
γーク゛ルタミルトランスへ゜フ゜チタ゛ーセ゛	同上	同上
(γ-GTP) 活性		
トリグリセライド濃度	GPO・HDAOS(グリセリン消去)法	同上
無機リン濃度	モリブデン酸直接法	同上
総ビリルビン濃度	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゛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

上記の測定結果のうち、AST (GOT) 活性の項目における雌 1 例 (動物番号 FB04005) の測定値およびカリウムイオン濃度の項における雌 1 例 (動物番号 FB02011) の測定値は、定量限界以上であったため、希釈して再測定した値に希釈倍率を乗じた値を採用した。

13) 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

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高用量群のうち、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。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。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。

6. データ解析法

機能検査結果、性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率ならびに出生児の形態異常の 出現頻度については 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%)。

I. 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)

死亡および瀕死動物はいずれの群でも認められなかった。

対照群の雌1例(動物番号 FB01001)で削痩が投与40日(哺育1日)に認められたが、哺育2日には回復した。その他、300 mg/kg 投与群の雌1例(動物番号 FB03010)で上顎切歯の欠損が投与25~32日に観察されたが、被験物質投与の影響ではなく物理的衝撃によるものと推察された。

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)

投与期間中および回復期間中ともに、いずれの群においても特記すべき変化は認められず、 神経毒性を示唆する所見は観察されなかった。

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、100 mg/kg 投与群の雄では対照群に比較して体重が低値で推移したが、対照群との間に有意差は認められなかった。投与期間中の雌の体重にはいずれの PETE 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。

回復期間中、雌雄の体重はいずれの PETE 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。

5. 摂餌量 (Figs. 4~6、Tables 13~14、Appendix 13~14)

投与期間中、雌サテライト群の 1000 mg/kg 投与群で、投与 29~30 日に摂餌量が雌サテライト群の対照群に比較して有意な高値を示したが、サテライト群を除く雌雄いずれの PETE 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。

回復期間中の摂餌量には、対照群と 1000 mg/kg 投与群の間に有意差は認められなかった。

6. 血液学検査 (Table 15~16、Appendix 15~16)

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg 投与群の雌で血色素量およびヘマトクリット値が対照群に比較して有意に増加し、300 mg/kg 投与群の雌でプロトロンビン時間が対照群に比較して有意に延長した。雄では、いずれの PETE 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、雌雄とも対照群と 1000 mg/kg 投与群の間に有意差は認められなかった。

7. 血液生化学検査 (Table 17~18、Appendix 17~18)

投与期間終了時の検査では、雌雄いずれの PETE 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、1000 mg/kg 投与群の雌で尿素窒素濃度が対照群に比較して有意 に増加した。雄では、対照群と 1000 mg/kg 投与群の間に有意差は認められなかった。

8. 病理学検査

1) 器官重量 (Table 19~20、Appendix 19~20)

投与期間終了時の検査では、300 mg/kg 投与群の雌で脳の実重量が対照群に比較して有意に増加したが、相対重量には有意差は認められなかった。雄ではいずれの PETE 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、1000 mg/kg 投与群の雌で肝臓の相対重量が対照群に比較して有意に増加した。雄では対照群と1000 mg/kg 投与群の間に有意差は認められなかった。

2) 剖検所見

投与期間終了時の雌雄 (Table 21~22、Appendix 21~22)
 異常所見は認められなかった。

(2) 回復試験期間終了時の雌雄 (Table 23~24、Appendix 23~24)

対照群の雄1例の右後肢大腿骨に腫瘤が観察されたほか、異常所見は認められなかった。

3) 病理組織学所見

(1) 投与期間終了時の雄 (Table 25、Appendix 25)

精巣では、100 mg/kg 投与群の3例、300 mg/kg 投与群の1例に限局性の精細管萎縮が認められ、このうちの3例の精巣上体では、管腔内に細胞残屑が観察された。

肝臓では、1000 mg/kg 投与群および対照群の検査指定動物の全例に門脈周囲性の脂肪化、ほとんどの例に小肉芽腫がみられたが、両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

腎臓では、1000 mg/kg 投与群の 3 例、対照群の全例に好酸性小体が、1000 mg/kg 投与群の 4 例、対照群の 2 例の皮質に好塩基性尿細管がみられたが、いずれの例もごく軽度な変化であった。

脾臓では、1000 mg/kg 投与群および対照群の検査指定動物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。

その他、前立腺では、間質や上皮に好中球およびリンパ球の浸潤が、肺では、肺胞に限局性 の泡沫細胞の集簇あるいは動脈壁の鉱質沈着が、心臓では、限局性の心筋の変性/線維化がみ 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。

病理組織学検査を実施したその他の器官には、異常所見は認められなかった。

(2) 投与期間終了時の雌 (Table 26、Appendix 26)

卵巣では、1000 mg/kg 投与群の1例に卵胞嚢腫および閉鎖状態にある卵胞の増加が認められたほか、これに伴って確認できる黄体は著しく減少していた。

肝臓では、1000 mg/kg 投与群および対照群の検査指定動物の全例に門脈周囲性の脂肪化、ほとんどの例に小肉芽腫がみられたが、両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

腎臓では、1000 mg/kg 投与群の1例の皮質に好塩基性尿細管が、1000 mg/kg 投与群および対照群の各1例に鉱質沈着がみられたが、いずれの例もごく軽度な変化であった。

脾臓では、1000 mg/kg 投与群および対照群の検査指定動物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。

その他、肺に動脈壁の鉱質沈着が、胸腺の萎縮がそれぞれ両群に、心臓に限局性の心筋の変性/線維化が対照群に観察された。

病理組織学検査を実施したその他の器官には、異常所見は認められなかった。

(3) 回復試験期間終了時の雌雄 (Table 27~28、Appendix 27~28)

精巣および精巣上体では、異常所見は認められなかった。対照群の雄の1例で剖検時に腫瘤 が認められた右後肢大腿骨には、骨折による骨膜の増生および膜内骨化が観察された。

卵巣では、1000 mg/kg 投与群の1例に卵胞嚢腫が認められた。

II. 生殖発生毒性

1. 性周期および交配成績 Table 29~30、Appendix 29~30)

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 300 mg/kg 投与群で 1 例(動物番号 FB03010)、5 日周期(5 日間隔で発情を回帰)を示した動物が 100 mg/kg 投与群で 1 例(動物番号 FB02001)認められたが、その頻度には対照群と比較して有意差はなかった。

交配成績では全例が交尾したが、1000 mg/kg 投与群の1例で不妊が認められた。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 PETE 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 31、Appendix 31)

妊娠動物の全例が生児を出産し、妊娠期間は対照群と投与群との間に有意差は認められなかった。一方、直接観察できなかったものの、膣周囲の汚れがみられたため分娩状態が不良であったと判断された動物が、対照群の1例(動物番号 FB01001)で観察された。この動物は、分娩翌日に全哺育児のミルクスポット(腹側から透かしてみえる胃内の乳汁)の消失が観察されたが、哺育2日以降には、哺育状態の異常は観察されなかった。その他の動物では、分娩および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 31、Appendix 31)

黄体数、着床数および着床率に、対照群と PETE 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 31、Appendix 31)

産児数、分娩率、出産生児数、生児出産率、出生率、性比および哺育4日の生児数および新生児生存率に、対照群とPETE 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 体重 (Table 32、Appendix 32)

対照群と PETE 各投与群との間で、哺育児体重に有意差は認められなかった。

3) 形態観察所見 (Table 33)

哺育0日の生存産児の形態観察では、1000 mg/kg 投与群の雌1例(母動物番号 FB04007)で 曲尾が観察された。死亡児および哺育4日の剖検時の形態観察では、いずれの動物にも形態異 常は観察されなかった。

1. 反復投与毒性および回復性試験

死亡および瀕死動物はいずれの群でも認められず、被験物質の影響を示唆する一般状態の変化も認められなかった。また、詳細な症状観察や機能検査でも、神経毒性を示唆する所見は観察されず、投与期間中および回復期間中の体重および摂餌量にも被験物質投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg 投与群の雌で血色素量およびヘマトクリット値が対照群に比較して有意に増加し、300 mg/kg 投与群の雌でプロトロンビン時間が対照群に比較して有意に延長したが、いずれも用量に依存した変化ではないことから、被験物質の影響ではないと判断した。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群の雌で尿素窒素濃度の増加や、肝臓の相対重量の増加がみられたが、投与期間終了時の検査で、腎臓および肝臓に被験物質投与によると推定される変化が認められていないことから、個発的な変化と考えられる。

2. 生殖発生毒性

性周期の観察では、4日周期が 4/5 あるいは 5日周期に変化した動物が 300 および 100 mg/kg 投与群で各 1 例認められたが、1000 mg/kg 投与群では全例が 4 日周期であったことから、被験物質の性周期への影響を示唆するものではないと考えられる。交配成績では、1000 mg/kg 投与群で不妊が 1 例認められ、同例の卵巣には、卵胞嚢腫および閉鎖状態にある卵胞の増加が認められた。しかし、その他の動物は全て妊娠し、黄体数、着床数、妊娠期間、分娩および哺育状態に被験物質の影響を示唆する異常は観察されなかったこと、また、1000 mg/kg 投与群の精巣の組織検査でも、異常所見は認められなかったことから、生殖毒性を示唆するものではないとと考えられる。

出生児に関しても、産児数、出産生児数、生児出産率、出生率、性比および哺育4日の生児数および新生児生存率、さらには哺育児体重に、被験物質投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。哺育0日の生存産児の形態観察では、1000 mg/kg 投与群の雌1例で曲尾が観察されたが、その他の動物に尾の異常は観察されなかったことから、自然発生奇形と推察される。

3. 無作用量

以上の結果より、本試験条件下でのPETEの無作用量は、反復投与毒性および生殖発生毒性のいずれに関しても、PETE 投与に起因した影響が認められなかったことから、1000 mg/kg/dayと判断された。

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)

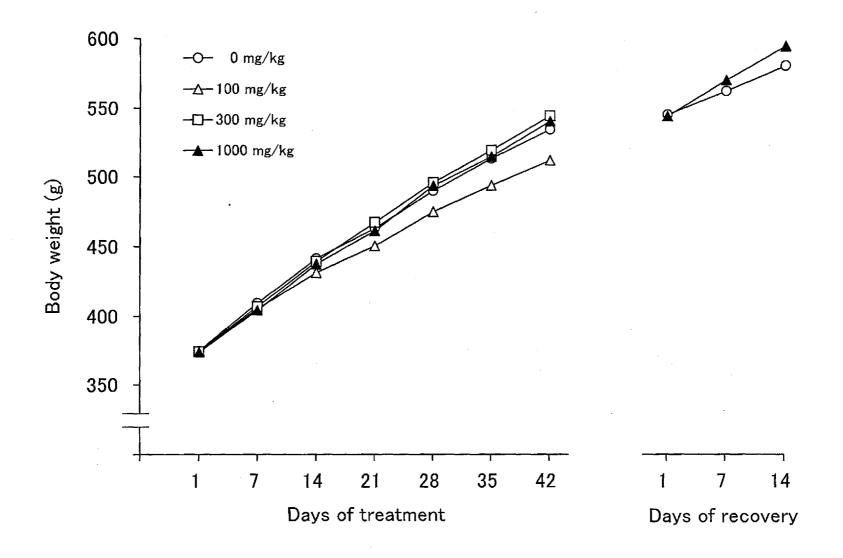


Fig.1 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats.

Body weight of males.

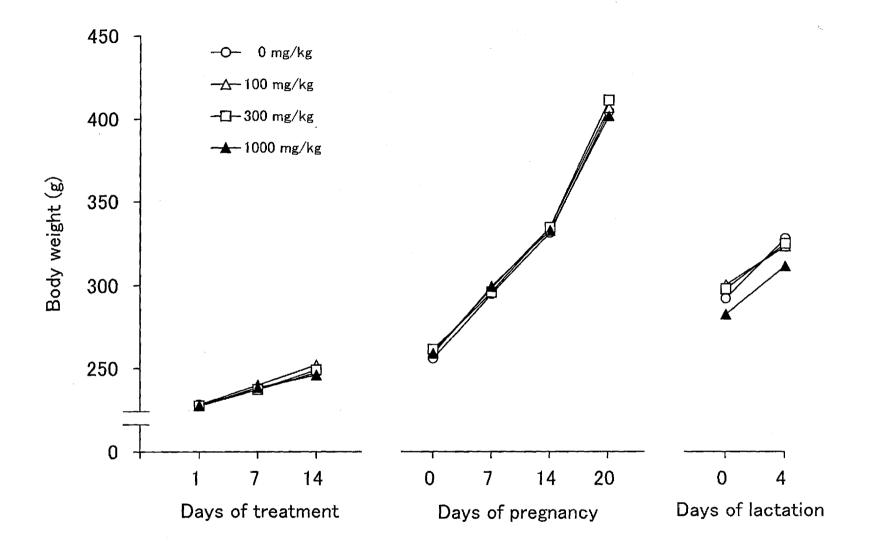


Fig.2 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats.

Body weight of dams.

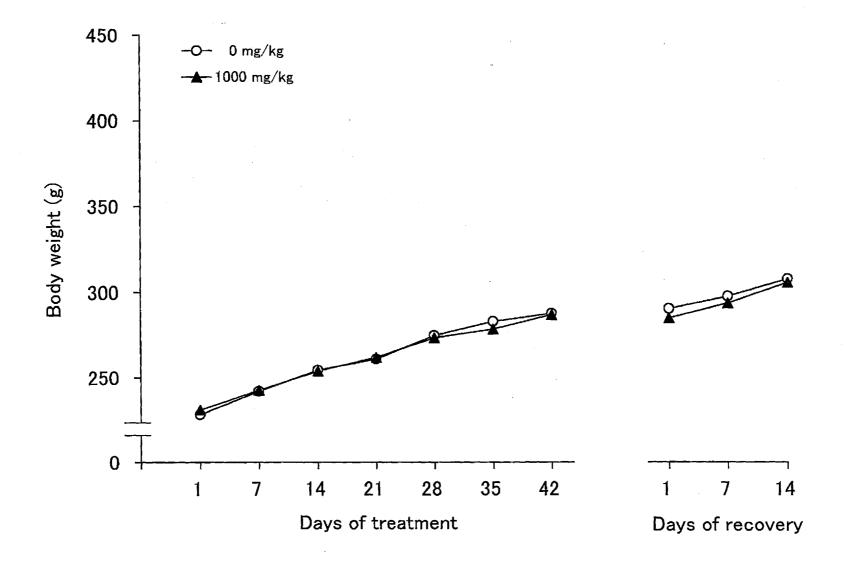


Fig.3 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats.

Body weight of female satellite groups.

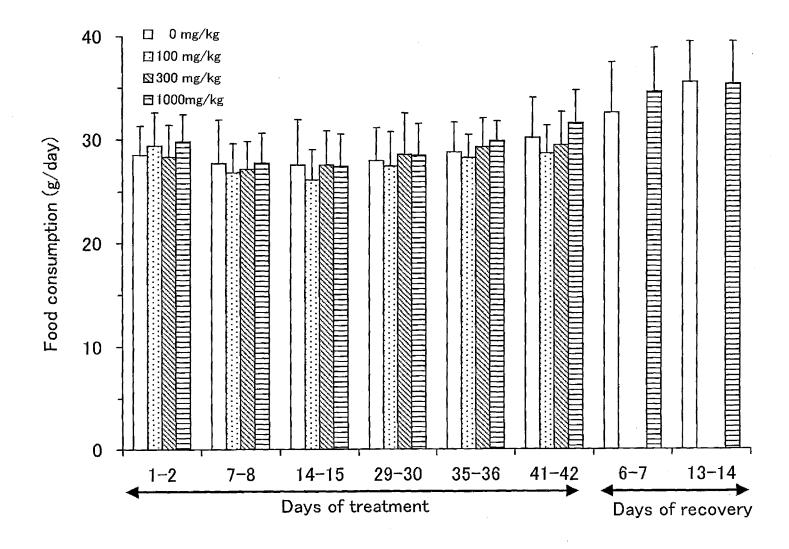


Fig.4 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats.

Food consumption of males.

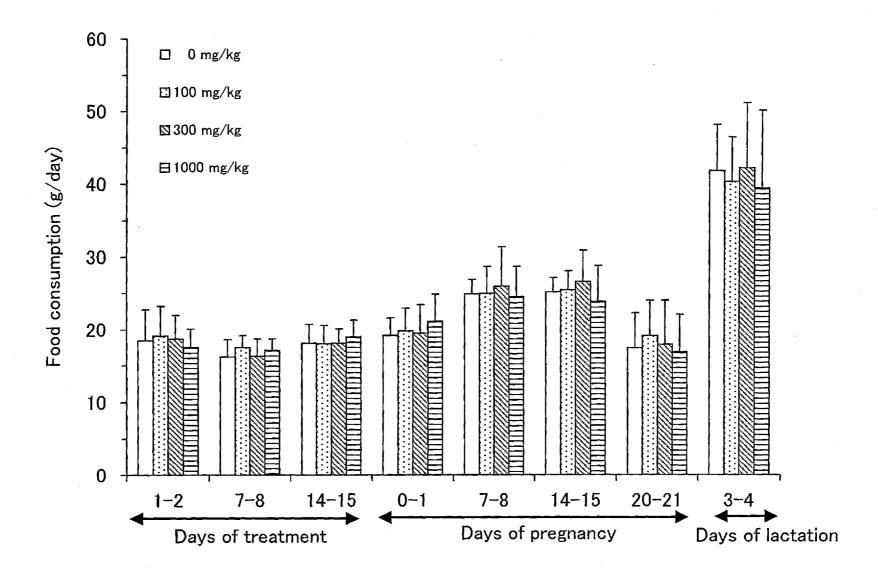


Fig.5 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats.

Food consumption of dams.

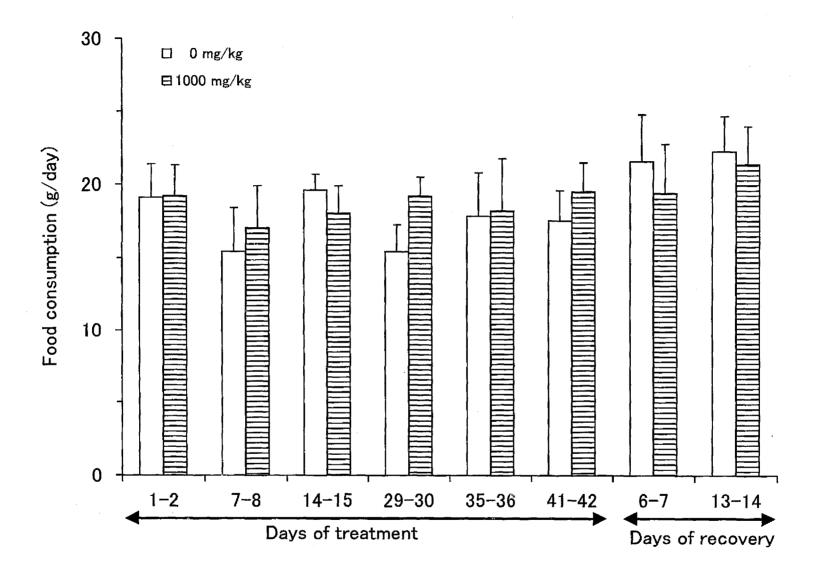


Fig.6 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats.

Food consumption of female satellite groups.

(TABLE INDEX)

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of hexanoic acid, 2-ethyl, 2,2-bis[[2-cthyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester 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
3-1~3-2	3-1-1~3-2-4	Detailed clinical observations of males
4-1~4-4	4-1-1~4-4-2	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
8-1~8-2	8-1-1~8-2-2	Body weight of females
9	9-1~9-4	Body weight gain of males
10-1~10-2	10-1-1~10-2-2	Body weight gain of females
11	11-1~11-4	Cumulative body weight gain of males
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	Hematological findings of males and females at the end of dosing period
16	16-1~16-2	Hematological findings of males and females at the end of recovery period
17	17-1~17-4	Biochemical findings of males and females at the end of dosing period
18	18-1~18-2	Biochemical findings of males and females at the end of recovery period
19	19-1~19-4	Absolute and relative organ weight of males and females at the end of dosing period
20	20-1~20-2	Absolute and relative organ weight of males and females at the end of recovery period
21	21	Macroscopic findings of males at the end of dosing period
22	22	Macroscopic findings of females at the end of dosing period
23	23	Macroscopic findings of males at the end of recovery period
24	24	Macroscopic findings of females at the end of recovery period
25	25	Histopathological findings of males at the end of dosing period
26	26	Histopathological findings of females at the end of dosing period
27	27	Histopathological findings of males at the end of recovery period
28	28	Histopathological findings of females at the end of recovery period
29	29-1~29-4	Estrous cycle of dams
30	30-1~30-4	Reproductive performance of animals
31	31-1~31-4	Development of pups up to day 4 of lactation
32	32-1~32-4	Mean body weight of pups up to day 4 of lactation
33	-	Morphological observations of pups

Table 1 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Clinical signs of males

		Initial number	Number	of animals wi	th clinical sig	ns					
Clinical sings	Dose (mg/kg)	of	Days of t	reatment		Days of r	Total				
		animals	1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	1-7	8-14	
	0 a	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Abnormality	100	12	0	0	0	0	0	0			0
	300	12	0	0	0	0	0	0			0
	1000	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)
^b the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 1000 mg/kg groups

Table 2-1
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats
Clinical signs of females, dams

		Initial number	Number	of animals wi	th clinical sig	ns						
Clinical sings	Dose (mg/kg)	of	Days of t	Days of treatment								
·	<u> </u>	animals	1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	·		
Emaciation	0 ^a	12	0	0	0	0	0	1	0	1		
	100	12	0	0	0	0	0	0	0	0		
	300	12	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1000	12	0	0	0	0	0	0	0	0		
	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0		
Loss of the upper incisor	100	12	0	0	0	0	0	0	0	0		
Loss of the upper meisor	300 .	12	0	0	0	1	1	0	0	1		
	1000	12	0	0	0	0	0	0	0	0		

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 2-2

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

Clinical signs of females, satellite groups

		Initial number	Number o	of animals wi	th clinical sig	gas		-			
Clinical sings	Dose (mg/kg)	of	Days of t	reatment	Days of r	Total					
	·	animals	1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	1-7	8-14	
Abnormality	0 ^a	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aonormanty	1000	5	0	0	0	0	0	0	. 0	0	0

a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 3-1 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Detailed clinical observations of males

		Initial number									
Findings	Dose (mg/kg)	of	Pre-treatment	Days of t	reatment		Days of	recovery b			
		animals		7	14	21	28	35	42	7	14
[Posture in home-cage]	0 ^a	12	0 °	0	0	0	0	0	0	0	0
Rearing	100	12	0	0	1	0	0	0	0		
	300	12	0	0	1	1	0	0	2		
	1000	12	2	0	3	0	0	1	1	1	0
[Home-cage activity]	0	12	2 °	1	2	3	10	5	4	0	3
Asleep	100	12	3	1	0	4	10	8	8		
	300	12	2	1	0	4	4	6	3		
	1000	12	1	0	1	2	7	2	1	1	3
[Ease of removing rat from cage]	0	12	18 d	2	2	4	2	0	2	0	0
Very easy (score 0)	100	12	14	6	6	4	2	6	0		
Vocalization without resistance (score 2)	300	12	8	4	2	2	2	4	4		
Rat flinched (score 4)	1000	12	16	10	4	4	4	2	2	0	0
[Reactivity to being handled]	0	12	28 d	4	4	0	2	4	4	0	0
Very low (score 0)	100	12	22	6	6	6	6	8	6		
Vocalization without resistance (score 2)	300	12	14	6	6	4	4	6	4		
Slight resistance to being handled (score 4)	1000	12	24	8	0	4	0	2	0	0	0

a vehicle control, com oil (2 mL/kg)
b the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 1000 mg/kg groups
c Values represent number of animals with the findings.

d Values represent total score of each groups.

Table 3-2

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

Detailed clinical observations of males

		Initial number	_								1
Findings	Dose (mg/kg)	of	Pre-treatment	Days of t	reatment		- 			Days of a	recovery
		animals	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	7	14	21	28	35	42	7	14
[Exploration]	0 ^a	12	48 ^c	48	48	48	48	48	48	20	20
Normal (score 4)	100	12	48	48	48	48	48	48	48		
Slight increase (score 6)	300	12	50	48	48	48	48	48	48		
	1000	12	48	48	50	48	48	48	48	20	20
[Grooming]	0	12	0 °	0	0	4	0	0	0	0	0
None (score 0)	100	12	0	0	0	0	4	0	0		
Occasional (score 4)	300	12	0	0	0	0	4	0	0		
	1000	12	0	0 .	0	0	0	0	0	0	0
[Vocalization]	0	12	4 °	0	0	0	0	0	0	0	0
None (score 0)	100	12	4	0	0	0	0	0	0		
Occasional (score 4)	300	12	4	. 0	0	0	0	0	0		
	1000	12	0	0	0	0	0	0	0	. 0	0
[Straub tail]	0	12	4 ^c	4	4	0	0	0	0	0	0
None (score 0)	100	12	0	0	4	0	0	0	0		
Slight (score 4)	300	12	0	0	0	0	0	0	0		
	1000	12	0	4	4	0	0	0	0	0	0

^a vehicle control, com oil (2 mL/kg)

b the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 1000 mg/kg groups

^c Values represent total score of each group.

Table 4-1 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE 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	The faculton period
[Posture in home-cage]	0 a	12	0 b	1	0	0	0	0	0
Rearing	100	12	0	0	0	0	0	0	0
	300	12	1	2	0	0	0 -	0	0
	1000	12	0	2	0	. 0	0	0	0
[Home-cage activity]	0	12	О р	7	0	5	5	4	2
Asleep	100	12	3	5	0	6	5	3	3
	300	12	0	1	0	4	3	6	1
	1000	12	0	6	. 1	8	6	3	. 1
[Ease of removing rat from cage]									
Very easy (score 0)	0	12	16 °	4	6	4	2	0	2
Vocalization without resistance (score 2)	100	12	10	8	4	4	2	0	4
Rat flinched (score 4)	300	12	16	6	4	10	4	0	0
Runs around cage (score 6)	1000	12	12	2	4	2	0	0	2
Aggressive (score 8)		·							
[Reactivity to being handled] Very low (score 0) Vocalization without resistance (score 2) Slight resistance to being handled (score 4)	0	12	20 °	6	12	6	12	2	0
	100	12	10	4	2	6	10	0	. 0
	300	12	16	б	10	12	6	0	0
Resistance to being handled (score 4)	1000	12	22	4	4	8	6	0	0

^a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)
^b Values represent number of animals with the findings.

^c Values represent total score of each group.

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

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of	Pre-treatment	Days of t	reatment					Days of 1	b recovery
		animals		7	14	21	28	35	42	7	14
[Posture in home-cage] Rearing	0 ^a	12	0 °	I	0	0	0	3	0	0	0
	1000	12	0	1	0	0	0	0	0	0	0
[Home-cage activity] Asleep	0	12	0 °	1	0	2	1	0	0	0	2
	1000	12	2	1	0	1	2	1	0	0	0
[Ease of removing rat from cage] Very easy (score 0) Vocalization without resistance (score 2)	0	12	2 ^d	4	4	4	2	2	8	0	2
Rat flinched (score 4) Runs around cage (score 6)	1000	12	2	2	2	6	4	0	0	2	0
[Reactivity to being handled] Very low (score 0) Vocalization without resistance (score 2)	0	12	8 d	2	0	8	4	4	8	0	2
Slight resistance to being handled (score 4) Resistance to being handled (score 6)	1000	12	8	2	6	8	4	0	0	2	0

a vehicle control, com oil (2 mL/kg)
b the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 1000 mg/kg groups
c Values represent number of animals with the findings.

^d Values represent total score of each group.

Table 4-3 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Detailed clinical observations of females, dams

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of	Pre-treatment	Days of t	reatment				The lactation period
		animals		7	14	21	28	35	
[Exploration]	0 ^a	12	48 b	48	48	50	48	48	48
Normal (score 4)	100	12	48	48	48	50	48	48	48
Slight increase (score 6)	300	12	48	48	48	48	48	48	48
•	1000	12	48	48	48	48	48	48	44 d
[Straub tail]	0	12	8 b	8	8	4	0	0	8
None (score 0)	100	12	0	12	12	4	0	0	4
Slight (score 4)	300	12	4	4	8	8	0	0	12
	1000	12	8	8	12	4	0	4	4 ^d
[Stereotypy]	0	12	0 °	0	0	0	0	0	0
Rearing	100	12	0	0	0	0	0	0	0
	300	12	0	0	0	0	0	0	0
	1000	12	0	2	0	0	0	0	O d

a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

^b Values represent total score of each group

^c Values represent number of animals with the findings.
^d Eleven animals were examined in the lactation period

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

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of	Pre-treatment	Days of t	reatment					Days of 1	ecovery
		animals		7	14	21	28	35	42	7	14
[Exploration]	0 ^a	12	20 ^b	20	20	20	20	20	20	20	20
Normal (score 4) Slight increase (score 6)											
,	1000	12	20	20	20	22	20	20	20	20	20
[Straub tail]	0	12	0 b	4	8	12	0	. 0	0	8	0
None (score 0) Slight (score 4)											
Severe (score 8)	1000	12	0	8	8	8	0	0	0	4	0
[Stereotypy]	0	12	0 °	0	0	0	0	0	0	0 -	0
Rearing											
	1000	12	. 0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)
b Values represent total score of each group.</sup>

^c Values represent number of animals with the findings.

Table 5 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Functional findings of males and females at the end of dosing period

Compound			PETE			
Dose (mg/kg)	o ^a	100	300	1000		
<u>Male</u>						
Number of animals	. 10	5	5	10		
Pupillary reflex	100	100	100	100		
Eyelid reflex	100	100	100	100		
Visual placing	100	100	100	100		
Withdrawal reflex	100	100	100	100		
Prayer's reaction	100	100	100	100		
Startle reaction	100	100	100	100		
Righting reflex	100	100	100	100		
⁷ emale, dam						
Number of animals	5	5	5	5		
Pupillary reflex	100	100	100	100		
Eyelid reflex	100	100	100	100		
Visual placing	100	100	100	100		
Withdrawal reflex	100	100	100	100		
Prayer's reaction	100	100	100	100		
Startle reaction	100	100	100	100		
Righting reflex	100	100	100	100		
emale, satellite group						
Number of animals	5			5		
Pupillary reflex	100			100		
Eyelid reflex	100			100		
Visual placing	100			100		
Withdrawal reflex	100			100		
Prayer's reaction	100		·	100		
Startle reaction	100			100		
Righting reflex	100			100		

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent % of animals showing normal responses.

a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 6 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Functional findings of males and females at the end of recovery period

Compound	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	PETE
Dose (mg/kg)	0 ^a	1000
Male		
Number of animals	5	5
Pupillary reflex	100	100
Eyelid reflex	100	100
Visual placing	100	100
Withdrawal reflex	100	100
Prayer's reaction	100	100
Startle reaction	100	100
Righting reflex	100	100
Female, satellite group		
Number of animals	5	5
Pupillary reflex	100	100
Eyelid reflex	100	100
Visual placing	100	100
Withdrawal reflex	100	100
Prayer's reaction	100	100
Startle reaction	100	100
Righting reflex	100	100

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent % of animals showing normal responses.

* vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 7 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Body weight of males (g)

PETE									
0ª		100		300		1000			
374.6 ±	24.0 (12)	373.6 ± 18.	0 (12)	374.1 ±	26.2 (12)	373.7 ±	21.3 (12)		
409.6 ±	29.0 (12)	405.4 ± 23.	9 (12)	407.0 ±	31.9 (12)	404.4 ±	26.6 (12)		
441.4 ±	32.0 (12)	431.4 ± 27.	4 (12)	439.4 ±	38.2 (12)	437.5 ±	31.9 (12)		
463.1 ±	34.7 (12)	450.4 ± 30.	5 (12)	467.1 ±	44.7 (12)	461.1 ±	27.9 (12)		
489.7 ±	37.1 (12)	474.8 ± 34.	5 (12)	495.7 ±	53.5 (12)	493.4 ±	32.1 (12)		
513.2 ±	40.9 (12)	493,6 ± 39.	3 (12)	519.3 ±	58.2 (12)	514.5 ±	35.4 (12)		
534.4 ±	46.4 (12)	511.8 ± 41.	7 (12)	544 .3 ±	62.4 (12)	540.3 ±	37.8 (12)		
545.3 ±	55.9 (5)					544.0 ±	34.9 (5)		
562.3 ±	59.9 (5)					570.0 ±	30.7 (5)		
580.4 ±	57.1 (5)					594,3 ±	31.6 (5)		
	374.6 ± 409.6 ± 441.4 ± 463.1 ± 489.7 ± 513.2 ± 534.4 ± 545.3 ± 562.3 ±	$374.6 \pm 24.0 (12)$ $409.6 \pm 29.0 (12)$ $441.4 \pm 32.0 (12)$ $463.1 \pm 34.7 (12)$ $489.7 \pm 37.1 (12)$ $513.2 \pm 40.9 (12)$ $534.4 \pm 46.4 (12)$ $545.3 \pm 55.9 (5)$ $562.3 \pm 59.9 (5)$	$374.6 \pm 24.0 (12)$ $373.6 \pm 18.$ $409.6 \pm 29.0 (12)$ $405.4 \pm 23.$ $441.4 \pm 32.0 (12)$ $431.4 \pm 27.$ $463.1 \pm 34.7 (12)$ $450.4 \pm 30.$ $489.7 \pm 37.1 (12)$ $474.8 \pm 34.$ $513.2 \pm 40.9 (12)$ $493.6 \pm 39.$ $534.4 \pm 46.4 (12)$ $511.8 \pm 41.$	0^{a} $374.6 \pm 24.0 (12)$ $409.6 \pm 29.0 (12)$ $405.4 \pm 23.9 (12)$ $441.4 \pm 32.0 (12)$ $431.4 \pm 27.4 (12)$ $463.1 \pm 34.7 (12)$ $450.4 \pm 30.5 (12)$ $489.7 \pm 37.1 (12)$ $474.8 \pm 34.5 (12)$ $513.2 \pm 40.9 (12)$ $493.6 \pm 39.3 (12)$ $534.4 \pm 46.4 (12)$ $511.8 \pm 41.7 (12)$ $545.3 \pm 55.9 (5)$ $562.3 \pm 59.9 (5)$	0^{4} 100 300 $374.6 \pm 24.0 (12)$ $373.6 \pm 18.0 (12)$ $374.1 \pm 409.6 \pm 29.0 (12)$ $405.4 \pm 23.9 (12)$ $407.0 \pm 441.4 \pm 32.0 (12)$ $431.4 \pm 27.4 (12)$ $439.4 \pm 463.1 \pm 34.7 (12)$ $450.4 \pm 30.5 (12)$ $467.1 \pm 489.7 \pm 37.1 (12)$ $474.8 \pm 34.5 (12)$ $495.7 \pm 513.2 \pm 40.9 (12)$ $493.6 \pm 39.3 (12)$ $519.3 \pm 534.4 \pm 46.4 (12)$ $511.8 \pm 41.7 (12)$ $544.3 \pm 55.9 (5)$ $562.3 \pm 59.9 (5)$	$0^{a} \qquad 100 \qquad 300$ $374.6 \pm 24.0 (12) \qquad 373.6 \pm 18.0 (12) \qquad 374.1 \pm 26.2 (12)$ $409.6 \pm 29.0 (12) \qquad 405.4 \pm 23.9 (12) \qquad 407.0 \pm 31.9 (12)$ $441.4 \pm 32.0 (12) \qquad 431.4 \pm 27.4 (12) \qquad 439.4 \pm 38.2 (12)$ $463.1 \pm 34.7 (12) \qquad 450.4 \pm 30.5 (12) \qquad 467.1 \pm 44.7 (12)$ $489.7 \pm 37.1 (12) \qquad 474.8 \pm 34.5 (12) \qquad 495.7 \pm 53.5 (12)$ $513.2 \pm 40.9 (12) \qquad 493.6 \pm 39.3 (12) \qquad 519.3 \pm 58.2 (12)$ $534.4 \pm 46.4 (12) \qquad 511.8 \pm 41.7 (12) \qquad 544.3 \pm 62.4 (12)$ $545.3 \pm 55.9 (5)$ $562.3 \pm 59.9 (5)$	$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean \pm S.D. (N) ^a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 8-1 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Body weight of females, dams (g)

Compound		-						PETE						
Dose (mg/kg)	o ^a				100				300			10	00	
Days of treatment														
1 (initial body weight)	228.4 ±	8.4	(12)	228.4	±	5.4	(12)	227.	7 ±	10.1	(12)	227.9	9.8	(12)
7	237.6 ±	9.4	(12)	240.3	±	7.9	(12)	237.	ó ±	11.2	(12)	238.7	12.9	(12)
14	247.5 ±	13.2	(12)	252.2	±	11.1	(12)	249.	3 ±	13.5	(12)	2 46.2 ±	14.9	(12)
Days of pregnancy														
0	256.2 ±	12.2	(12)	260.3	±	7.6	(12)	261.	ó ±	17.5	(12)	259.0 ±	20.6	(11)
7	295.0 ±	16.1	(12)	298.5	±	12.1	(12)	296.0) ±	23.7	(12)	299.3 ±	19.3	(11)
14	331.4 ±	17.4	(12)	334.5	±	13.0	(12)	334.	7 ±	26.4	(12)	332.8 ±	20.2	(11)
20	404.5 ±	24.0	(12)	406.8	±	19.1	(12)	411.	2 ±	31.0	(12)	401.9 ±	23.3	(11)
Days of lactation														
0	292.1 ±	27.3	(12)	300.1	±	24.7	(12)	297.0	5 ±	36.9	(12)	282.6 ±	29.1	(11)
4	327.9 ±	20.5	(12)	323.1	土	14.8	(12)	325.0) ±	27.0	(12)	311.3 ±	22.6	(11)

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D. (N) a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 8-2 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Body weight of females, satellite groups (g)

Compound		PETE
Dose (mg/kg)	o ^a	1000
Days of treatment		
1 (initial body weight)	227.9 ± 5.9	$230.8 \pm 5.0 (5)$
7	241.9 ± 4.5	$5 (5) 242.5 \pm 6.2 (5)$
14	254.4 ± 3.6	$5 (5) 253.8 \pm 9.1 (5)$
21	261.0 ± 11.5	$5 (5) 261.8 \pm 9.5 (5)$
28	274.7 ± 12.0	$273.4 \pm 12.9 (5)$
35	282.9 ± 13.3	$278.4 \pm 10.6 (5)$
42	287.5 ± 11.2	$286.9 \pm 14.5 \tag{5}$
Days of recovery		
1	290.1 ± 11.6	$5 (5) 284.7 \pm 17.4 (5)$
7	297.2 ± 13.0	$293.4 \pm 17.0 $ (5)
14	307.1 ± 12.2	$305.1 \pm 20.3 (5)$

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D. (N) vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 9 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Body weight gain of males (g)

Compound						PETE				···	
Dose (mg/kg)	0 ^a		100			300			1000		
Days of treatment											
1 - 7	35.0 ± 6.6	(12)	31.8 ±	7.7	(12)	32.9 ±	7.3	(12)	30.7 ±	8.1	(12)
7 -14	31.8 ± 5.1	(12)	26.0 ±	7.2	(12)	32.5 ±	9.3	(12)	33.1 ±	9.5	(12)
14 -21	21.7 ± 4.1	(12)	19.0 ±	9.2	(12)	27.6 ±	8.5	(12)	23.6 ±	6.0	(12)
21 -28	26.6 ± 4.1	(12)	24.5 ±	6.4	(12)	28.6 ±	9.6	(12)	32.4 ±	5.0	(12)
28 -35	23.6 ± 6.4	(12)	18.8 ±	6.7	(12)	23.6 ±	6.7	(12)	21.1 ±	4.9	(12)
35 -42	21.2 ± 8.5	(12)	18.2 ±	4.9	(12)	25.0 ±	6.5	(12)	25.8 ±	5.0	(12)
Days of recovery					*						
1 - 7	17.0 ± 10.0	(5)							26.0 ±	6,9	(5)
7 -14	18.1 ± 7.1	(5)							24.3 ±	7.4	(5)

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D. (N) a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 10-1 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Body weight gain of females, dams (g)

Compound			PE	ΓE	
Dose (mg/kg)	o ^a		100	300	1000
Days of treatment					
1 -7	9.2 ±	6.6 (12)	11.9 ± 6.5 (12)	9.9 ± 6.4 (12)	$10.8 \pm 5.5 (12)$
7 -14	9.9 ±	6.1 (12)	11.9 ± 6.8 (12)	11.7 ± 6.7 (12)	$7.5 \pm 5.7 $ (12)
Days of pregnancy					
0 - 7	38.8 ±	8.6 (12)	$38.2 \pm 7.1 (12)$	$34.4 \pm 14.8 (12)$	40.4 ± 8.8 (11)
7 -14	36.3 ±	4.9 (12)	$36.0 \pm 5.2 (12)$	38.7 ± 8.1 (12)	$33.5 \pm 4.9 (11)$
14 -20	73.1 ±	12.3 (12)	$72.3 \pm 10.2 $ (12)	$76.4 \pm 13.9 $ (12)	69.1 ± 9.7 (11)
Days of lactation					
0 - 4	35.8 ±	18.2 (12)	$23.0 \pm 21.4 $ (12)	27.5 ± 17.2 (12)	$28.7 \pm 14.4 $ (11)

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D. (N) vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 10-2 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Body weight gain of females, satellite groups (g)

Compound		<u> </u>	PETE	
Dose (mg/kg)	0 ^a		1000	
Days of treament				
1 - 7	14.0 ± 3	.3 (5)	11.7 ± 2.9	(5)
7 -14	12.5 ± . 3	.4 (5)	11.3 ± 6.0	(5)
14 -21	6.6 ± 9	(5)	8.0 ± 2.6	(5)
21 -28	13.6 ± 4	.5 (5)	11.6 ± 5.8	(5)
28 -35	8.3 ± 3	.5 (5)	4.9 ± 5.8	(5)
35 -42	4.6 ± 4	.6 (5)	8.5 ± 4.4	(5)
Days of recovery				
1 - 7	7.0 ± 4	.8 (5)	8.7 ± 4.0	(5)
7 -14		.2 (5)	11.7 ± 5.0	(5)

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D. (N) ^a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 11 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Cumulative body weight gain of males (g)

Compound									PETE							
Dose (mg/kg)		0ª				100				300				000		
Days of treatment																
1 - 7		35.0 ±	6.6	(12)	31.8	±	7.7	(12)	32.9	±	7.3	(12)	30.7	±	8.1	(12)
1 -14		66.8 ±	11.0	(12)	57.8	±	13.5	(12)	65.3	±	14.9	(12)	63.8	±	15.1	(12)
1 -21		88.5 ±	14.2	(12)	76.8	±	17.8	(12)	93.0	±	21.3	(12)	87.4	±	10.4	(12)
1 -28		115.1 ±	16.8	(12)	101.2	±	22.0	(12)	121.6	±	29.9	(12)	119.7	±	13.7	(12)
1 -35		138.7 ±	20.6	(12)	120.0	±	26.5	(12)	145.2	±	34.7	(12)	140.8	±	17.0	(12)
1 -42	. •	159.8 ±	26.7	(12)	138.2	±	28.6	(12)	170.2	±	38.0	(12)	166.5	±	19.1	(12)
Days of recovery																
1 - 7		17.0 ±	10.0	(5)									26.0	±	6.9	(5)
1 -14		35.1 ±	6.9	(5)									50.3	±	9.3 *	(5)

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D. (N)

a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

* significantly different from control, p<0.05

Table 12-1 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Cumulative body weight gain of females, dams (g)

Compound		PETE										-	
Dose (mg/kg)	0 ^a				100			30	00		1000		
Days of treatment													
1 -7	9.2 ±	6.6	(12)	11.9	±	6.5	(12)	9.9 ±	: 6	4 (12)	10.8 ±	5.5	(12)
1 -14	19.1 ±	9.7	(12)	23.8	±	7.3	(12)	21.7 ±	= 7	6 (12)	18.3 ±	7.8	(12)
Days of pregnancy													
0 - 7	38.8 ±	8.6	(12)	38.2	±	7.1	(12)	34.4 ±	= 14	8 (12)	40.4 ±	8.8	(11)
0 -14	75.1 ±	11.7	(12)	74.2	±	8.2	(12)	73.2 ±	: 15.	5 (12)	73.8 ±	13.4	(11)
0 -20	148.3 ±	17.6	(12)	146.5	±	15.0	(12)	149.6 ±	20.	5 (12)	142.9 ±	15.5	(11)
Days of lactation													
0 - 4	35.8 ±	18.2	(12)	23.0	土	21.4	(12)	27.5 ±	: 17.	2 (12)	28.7 ±	14.4	(11)

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean \pm S.D. (N) ^a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 12-2 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Cumulative body weight gain of females, satellite groups (g)

Compound			PETE					
Dose (mg/kg)	o ^a		1000					
Days of treatment								
1 - 7	14.0 ±	3.3 (5)		11.7 ±	2.9	(5)		
1 -14	26.5 ±	3.2 (5)		23.0 ±	6.1	(5)		
1 -21	33.2 ±	6.9 (5)		31.0 ±	5.5	(5)		
1 -28	46.8 ±	6.9 (5)		42.6 ±	7.9	(5)		
1 -35	55.1 ±	8.8 (5)		47.5 ±	6.7	(5)		
1 -42	59.7 ±	8.4 (5)		56.1 ±	10.1	(5)		
Days of recovery								
1 - 7	7.0 ±	4.8 (5)		8.7 ±	4.0	(5)		
1 -14	17.0 ±	2.8 (5)		20.4 ±	6.7	(5)		

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D. (N) a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 13 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Food consumption of males (g/day)

Compound					PETE	
Dose (mg/kg)	0 ^a		100		300	1000
Days of treatment						
1 - 2	28.5 ±	2.8 (12)	29.4 ± 3.2	(12)	$28.3 \pm 3.1 (12)$	29.8 ± 2.6 (12)
7 - 8	27.7 ±	4.2 (12)	26.8 ± 2.8	(12)	$27.1 \pm 2.7 $ (12)	27.7 ± 2.9 (12)
14 -15	27.5 ±	4.4 (12)	26.1 ± 2.9	(12)	$27.5 \pm 3.3 (12)$	27.4 ± 3.1 (12)
29 -30	27.9 ±	3.2 (12)	27.4 ± 3.3	(12)	$28.5 \pm 4.0 (12)$	28.4 ± 3.1 (12)
35 -36	28.7 ±	2.9 (12)	28.2 ± 2.2	(12)	29.2 ± 2.8 (12)	29.8 ± 1.9 (12)
41 -42	30.1 ±	3.9 (12)	28.6 ± 2.7	(12)	$29.4 \pm 3.2 $ (12)	31.5 ± 3.2 (12)
Days of recovery						
6 - 7	32.5 ±	4.9 (5)				34.5 ± 4.3 (5)
13 -14	35.5 ±	3.9 (5)				35.3 ± 4.1 (5)

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean \pm S.D. (N) ^a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 14-1 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Food consumption of females, dams (g/day)

Compound					PETE	
Dose (mg/kg)	0 ^a		100		300	1000
Days of treatment						
1 - 2	18.5 ±	4.3 (12)	19.1 ± 4.1	(12)	$18.7 \pm 3.3 (12)$	$17.5 \pm 2.6 (12)$
7 - 8	16.2 ±	2.4 (12)	17.5 ± 1.7	(12)	$16.3 \pm 2.4 (12)$	17.1 ± 1.6 (12)
14 -15	18.1 ±	2.6 (12)	18.0 ± 2.6	(12)	$18.1 \pm 2.0 (12)$	$19.0 \pm 2.3 (12)$
Days of pregnancy						
0 - 1	19.2 ±	2.4 (12)	19.8 ± 3.1	(12)	$19.5 \pm 3.9 (12)$	$21.1 \pm 3.7 (11)$
7 - 8	24.8 ±	2.0 (12)	24.9 ± 3.7	(12)	25.9 ± 5.4 (12)	$24.4 \pm 4.2 $ (11)
14 -15	25.1 ±	2.0 (12)	25.4 ± 2.6	(12)	$26.5 \pm 4.3 (12)$	$23.8 \pm 4.9 $ (11)
20 -21	17.4 ±	4.8 (12)	19.1 ± 4.8	(12)	$17.9 \pm 6.0 (12)$	$16.8 \pm 5.2 (11)$
Days of lactation						
3 - 4	41.7 ±	6.4 (12)	40.2 ± 6.2	(12)	$42.1 \pm 9.0 (12)$	$39.3 \pm 10.8 $ (11)

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D. (N) a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

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

Compound			PETE	
Dose (mg/kg)	0 ^a		1000	
Days of treatment				·
1 - 2	19.1 ±	2.3 (5)	19.2 ±	2.1 (5)
7 - 8	15.4 ±	3.0 (5)	17.0 ±	2.9 (5)
14 -15	19.6 ±	1.1 (5)	18.0 ±	1.9 (5)
29 -30	15.4 ±	1.8 (5)	19.2 ±	1.3 ** (5)
35 -36	17.8 ±	3.0 (5)	18.2 ± 3	3.6 (5)
41 -42	17.5 ±	2.1 (5)	19.5 ± 2	2.0 (5)
Days of recovery	•			•
6 - 7	21.6 ±	3.2 (5)	19.4 ± 3	3.4 (5)
13 -14	22.3 ±	2.4 (5)	21.4 ± 2	2.6 (5)

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean \pm S.D. (N) a vehicle control, corn oil (2 mL/kg) ** significantly different from control, p<0.01

Table 15 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Hematological findings of males and females at the end of dosing period

Compound				PETE								
Dose (mg/kg)	0 ^a	ı	1	00			300		1	1000		
Male												
Number of animals	5			5			5			5		
RBC (× $10^4/\mu$ L)	768 ±	48	821	± 4	16	797	±	41	809	±	33	
Hemoglobin (g/dL)	14.1 ±	0.5	14.9	± 0	.9	14.2	±	0.9	14.6	Ŧ	0.4	
Hematocrit (%)	42.3 ±	1.1	44.3	± 2	.4	42.8	±	2.8	43.7	±	1.8	
MCV (fL)	55.2 ±	2.3	54.0	± 0	.9	53.7	±	1.3	54.1	±	0.9	
MCH (pg)	18.3 ±	0.7	18.1	± .0	.4	17.8	±	0.5	18.1	±	0.4	
MCHC (g/dL)	33.2 ±	0.4	33.5	± 0	.4	33.1	±	0.3	33.4	±	0.6	
WBC (×100/ μ L)	92.9 ±	24.7	76,8	± 23	.9	89.0	±	29.8	73.5	± -	11.4	
Differental leukocyte count (%)						ş-						
Neutrophil	15 ±	5	21	±	4	18	±	8	17	±	5	
Eosinophil	1 ±	0	1	±	1	2	±	1	2	±	1	
Basophil	0 ±	0	0	÷	0	0	±	0	0	±	0	
Monocyte	4 ±	1	5	±	1	7	±	5	3	±	1	
Lymphocyte	81 ±	: 7	73	Ŧ	4	74	土	12	78	±	6	
Platelet (×10 ⁴ / μ L)	104.9 ±	11.7	106.6	± 3	.3	111.1	±	4.9	105.2	±	12.7	
PT (sec)	16.0 ±	2.4	20,3	± 6	.2	19.9	±	4.4	20.8	±	1.9	
APTT (sec)	22.7 ±	2.1	23.7	± 2	0	23.8	±	2.0	24.7	±	1.1	
Female, dam												
Number of animals	5			5			5			5		
RBC (×10 4 / μ L)	651 ±	: 36	728		39	686		26	666		64	
Hemoglobin (g/dL)	13.1 ±	: 0.7	14.1	± 0	.5 *	13.5	±	0.3	12.9	±	0.8	
Hematocrit (%)	38.9 ±	: 2.0	42.2	± 1	.5 *	40.5	±	0.9	38.3	±	2.6	
MCV (fL)	59.7 ±	: 1.0	57.9	± 2	2.0	59.1	±	1.8	57.7	±	2.2	
MCH (pg)	20.1 ±	0.2	19.4	± 0	.6	19.6	±	0.7	19.4	±	0.8	
MCHC (g/dL)	33.6 ±	: 0.4	33.5	± 0	.2	33.2	Ŧ	0.4	33.6	Ŧ	0.5	
WBC (×100/ μ L)	81.9 ±	: 19.1	99.5	± 21	.8	108.5	±	23.6	105.4	±	21.5	
Differental leukocyte count (%)												
Neutrophil	16 ±	: 4	20	±	4	22	±	5	19	±	8	
Eosinophil	1 ±	= 0	1	±	1	1	±	0	1	±	0	
Basophil	0 ±	= 0	0	±	0	0	±	0	0	±	0	
Monocyte	7 ±	2	10	±	5	5	±	2	6	±	2	
Lymphocyte	76 ±	5	69	±	8	72	±	4	75	±	. 9	
Platelet (× $10^4/\mu$ L)	124.3 ±	16.8	120.4	± 6	5.4	121.4	±	7.7	129.5	±	27.3	
PT (sec)	12.1 ±	± 0.5	13.1	± (),5	13.2	±	0.7	* 12.6	土	0.5	
APTT (sec)	18.3 ±	b 0.6	19.2	± ().4	20.3	±	2.1	19.0	Ŧ	0.8	

Values represent mean±S.D.

vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

* significantly different from control, p<0.05

Table 16 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Hematological findings of males and females at the end of recovery period

Compound			PETE			
Dose (mg/kg)	0 ^a			1	000	
<u>Male</u>						
Number of animals	5				5	
RBC ($\times 10^4/\mu$ L)	808 ±	37		819	±	30
Hemoglobin (g/dL)	14.5 ±	0.5		14.6	±	0.5
Hematocrit (%)	43.5 ±	1.6		43.5	±	1.6
MCV (fL)	53.9 ±	2,9		53.1	±	0.4
MCH (pg)	18.0 ±	1.0		17.7	±	0.2
MCHC (g/dL)	33.4 ±	0.2		33.4	Ŧ	0.4
WBC (×100/ μ L)	94.3 ±	13.1		119.2	±	20.3
Differental leukocyte count (%)						
Neutrophil	15 ±	5		11	. ±	2
Eosinophil	1 ±	0		1	±	1
Basophil	0 ±	0		0	±	0
Monocyte	5 ±	2		4	±	1
Lymphocyte	79 ±	5		84	±	2
Platelet (×10 ⁴ / μ L)	111.2 ±	14.9		114.3	#	14.8
PT (sec)	17.5 ±	2.8		18.0	±	3.9
APTT (sec)	22.5 ±	1.9		23.4	±	1.6
Female, satellite group						
Number of animals	. 5				5	
RBC (× 10^4 / μ L)	750 ±	44		743		20
Hemoglobin (g/dL)	14.2 ±	0.9		13.9		0.4
Hematocrit (%)	42.1 ±	2.5		41.5	±	1.5
MCV (fL)	56.1 ±	0.2	·	55.9	±	1.4
MCH (pg)	18.9 ±	0.2		18.7	±	0.5
MCHC (g/dL)	33.7 ±	0.3		33.5	±	0.3
WBC (×100/ μ L)	43.3 ±	9.6		54.4	÷	16.5
Differental leukocyte count (%)						
Neutrophil	13 ±	5		16	±	5
Eosinophil	2 ±	1		2	Ŧ	1
Basophil	0 ±	0		0	±	0
Monocyte	3 ±	1		5	±	3
Lymphocyte	82 ±	5		78	±	7
Platelet (× $10^4/\mu$ L)	102,2 ±	9.1		99.0	±.	9.3
PT (sec)	11.9 ±	0.3		11.7	±	0.5
APTT (sec)	19.5 ±	1.8		19.8	±	1.0

Values represent mean±S.D.

a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 17 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Biochemical findings of males and females at the end of dosing period

Compound	<u>:</u>				F	PETE						<u></u>
Dose (mg/kg)		o ^a			00		3	300		1	000	
Male												
Number of animals		5			5			5			5	
Total protein (g/dL)	5.7	±	0.2	5.7	±	0.3	5.6	±	0.2	5.6	±	0.3
Albumin (g/dL)	3.7	土	0.1	3.6	±	0.2	3.5	±	0.2	3.6	±	0.2
A/G	1.77	±	0.18	1.73	±	0.15	1.75	±	0.30	1.78	±	0.18
Blood urea nitrogen (mg/dL)	18	±	1	18	±	2	18	±	2	19	土	4
Creatinine (mg/dL)	0.7	±	0.1	0.7	#	0.1	0.7	±	0.1	0.7	±	0.1
Glucose (mg/dL)	198	±	48	168	±	23	160	±	20	171	±	10
Total cholesterol (mg/dL)	50	±	. 12	47	Ŧ	11	50	土	7	44	±	5
Triglyceride (mg/dL)	30	±	7	22	Ŧ	6	22	土	13	24	±	12
ALP (U/L)	180	±	52	220	±	34	170	1.	24	186	±	62
ALT (GPT) (U/L)	30	±	4	34	土	7	33	±	8	29	±	6
AST (GOT) (U/L)	71	±	6	68	土	11	71	±	13	63	±	7
γ-GTP (U/L)	2	±	i	2	±	1	1	±	i	2	±	1
Total bilirubin (mg/dL)	0.03	±	0.01	0.03	±	0.02	0.04	±	0.01 -	0.03	±	0.02
Inorganic phosphorus (mg/dL)	6.2	±	0.6	6.8	±	0.8	6.5	±	1.1	6.3	±	0.6
Calcium (mg/dL)	9.3	±	0.1	9.3	±	0.3	9.4	±	0.3	9.2	±	0.2
Na (mEq/L)	146.8	±	1.0	147.0	±	1.1	145.8	±	1.2	145.4	±	0.5
K (mEq/L)	4.30	±	0.35	4.60	±	0.39	4.56	±	0.56	4.54	±	0.21
Cl (mEq/L)	108.0	±	1.2	107.8	±	1.2	107.3	±	1.7	106.7	±	1.5
emale, dam												
Number of animals		5			5			5			5	
Total protein (g/dL)	6.0		0.2	6.2		0.5	6.3		0.3	6.1		0.3
Albumin (g/dL)	4.0		0.2	4.2		0.2	4.0		0.1	3.9		0.1
A/G	1.93		0.15	2.12		0.31		±	0.14	1,77		0.14
Blood urea nitrogen (mg/dL)	_	Ŧ	4	14		1	14		2	14		1
Creatinine (mg/dL)	0.7		0.1	0.6		0.1	0.6		0.1	0.7		0.1
Glucose (mg/dL)	155		17	159		29	141		24	128		17
Total cholesterol (mg/dL)		¥	21		±	4	53		5	65		19
Triglyceride (mg/dL)		±	17		±		29		12	27		13
ALP (U/L)		±	28	87			95			87		44
ALT (GPT) (U/L)		±	11		±			±		140		203
AST (GOT) (U/L)		.t.	22		±		128			242		306
γ -GTP (U/L)	3	±	1		±			±			±	1
Total bilirubin (mg/dL)	0.03		0.01	0.05			0.05			0.04		0.02
Inorganic phosphorus (mg/dL)	7.3	Ŧ	0.7	7.3			7.5			6.8		0.8
Calcium (mg/dL)	9.6	±	0.2	9.8	±	0.6	9.6	±	0.4	9.4	±	0.4
Na (mEq/L)	143.3	±	1.8	142.9	±	1.5	143.3	±	0.8	143.5	±	1.3
K (mEq/L)	4.16	±	0.07	5.82	±	2.15	5.55	±	2.48	4.09	±	0.37
Cl (mEq/L)	106.7	±	0.5	106.5	±	1.5	107.4	土	1.5	107.6	土	2.0

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D.

a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 18 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Biochemical findings of males and females at the end of recovery period

ompound			PETE	TE			
ose (mg/kg)	<u>_</u>	a	10	1000			
ale	_			_			
Number of animals	5			5			
Total protein (g/dL)	6.1 ±		6.0				
Albumin (g/dL)	3.8 ±		3.7				
A/G	1.72 ±	0.15	1.68				
Blood urea nitrogen (mg/dL)	15 ±		16	± 2			
Creatinine (mg/dL)	0.7 ±	0.1	0.7	± 0.1			
Glucose (mg/dL)	184 ±	: 18	180	± 17			
Total cholesterol (mg/dL)	55 ±	: 19	50	± 12			
Triglyceride (mg/dL)	39 ±	21	45	± 23			
ALP (U/L)	165 ±	: 34	155	± 45			
ALT (GPT) (U/L)	27 ±	: 6	26	± 5			
AST (GOT) (U/L)	59 ±	: 5	59	± 10			
γ -GTP (U/L)	1 ±	: 0	1	± 1			
Total bilirubin (mg/dL)	0.02 ±	0.01	0.01	± 0.01			
Inorganic phosphorus (mg/dL)	6.1 ±	. 0.9	6.1	± 0.8			
Calcium (mg/dL)	9.2 ±	0.3	9.3	± 0.4			
Na (mEq/L)	144.4 ±	0.9	143.8	± 0.8			
K (mEq/L)	4.08 ±	0.12	4.01	± 0.14			
CI (mEq/L)	107.4 ±	0.6	107.0	± 1.4			
emale, satellite group							
Number of animals	5			5			
Total protein (g/dL)	6.2 ±		6.3				
Albumin (g/dL)	4.0 ±	= 0.3	4.2				
A/G	1.89 ±		2.08				
Blood urea nitrogen (mg/dL)	19 ±		23				
Creatinine (mg/dL)	0.8 ±		0.8				
Glucose (mg/dL)	153 ±		170				
Total cholesterol (mg/dL)	62 ±	± 5	72				
Triglyceride (mg/dL)	18 ±	± 8	28				
ALP (U/L)	75 ±		76				
ALT (GPT) (U/L)	25 ±	± 12	32	± 7			
AST (GOT) (U/L)	65 ±	E 24	64	± 14			
γ -GTP (U/L)	2 ±	t 1	1	± 0			
Total bilirubin (mg/dL)	0.02 ±	± 0.01	0.03	± 0.00			
Inorganic phosphorus (mg/dL)	3.9 ±	Ŀ 0.7	4.5	± 1.0			
Calcium (mg/dL)	9.0	± 0.3	9.4	± 0.2			
Na (mEq/L)	143.1	± 0.5	142.6	± 0.9			
K (mEq/L)	4.06	± 0.22	4.01	± 0.38			
Cl (mEq/L)	109.6	± 0.7	109.5	± 1.8			

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D.

a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

* significantly different from control, p<0.05

Table 19

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

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

Compound									PETE					·
Dose (mg/kg)			o ^a				100			300		1	000	
Male	·····					-,			 					
Number of animals			5				5			5			5	
Terminal body weight	(g)	494.9	±	36.3		466.3	±	33.8	521.9	±	61.8	489.6	±	38,4
Brain	(g) (g%)	2.00 0.41	± ±	0.03 0.03	196	1.98 0.43		0.06 0.02	2.04 0.40	± ±	0.10 0.04	2,06 0.42	± ±	0.11 0.02
Thymus	(mg) (mg%)	342.7 69.0		99.4 17.7		330.9 71.4		69.1 16.6	344.3 66.4		79.6 15.4	350.3 72.0	±	36.6 10.5
Heart	(g) (g%)	1.42 0,29		0.10 0.01		1.43 0.31		0.22 0.05	1.49 0.29	± ±	0.11 0.03	1.51 0.31		0.11 0.01
Liver	(g) (g%)	13.94 2.83		1.18 0.25		12.64 2.71		1.45 0.13	14.75 2.82		2,39 0.20	13.90 2.83	土	1.91 0.21
Kidneys	(g) (g%)	3.12 0.63		0.19 0.05		3.23 0.69		0.31 0.03	3.35 0.65		0.12 0.09	3.36 0.69		0.27 0.04
Spleen	(g) (g%)	0.77 0.15		0.19 0.04		0.69 0.15		0.06 0.02	0.85 0.17		0.10 0.03	0.87 0.18		0.10 0.02
Adrenal glands	(mg) (mg%)	58.9 12.0		3.6 1.2		55.7 12.0		2.7 0.6	64.4 12.4		14.7 2.6	64.6 13.1		13.4 2.0
Testes	(g) (g%)	3.23 0.66		0.15 0.07		3.24 0.70		0.25 0.08	3.44 0.66		0.47 0.05	3.33 0.68		0.47 0.06
Epididymides	(g) (g%)	1.19 0.24		0.10 0.03		1.18 0.26		0.12 0.04	1.28 0.25		0.08 0.02	1.26 0.26		0.14 0.02
Female, dam				-			•							
Number of animals			5				5			5			5	
Terminal body weight	(g)	282.8	±	23.5		295.2	±	14.9	297.1	±	24.8	279.5	±	17.4
Brain	(g) (g%)	1.81 0.65		0.06 0.06		1.87 0.63		0.07 0.02	1.93 0.66		0.06 ** 0.07	1.84 0,66		0.04 0.05
Thymus	(mg) (mg%)	182.8 62.7		122.0 39.3		201.1 67.8		44.5 12.1	205.3 67.7		94.8 27.1	198.9 70.5		70.1 21.5
Heart	(g) (g%)	0.91 0.32		0.15 0.03		0.93 0.31		0.08 0.03	0.99 0.33		0.18 0.04	0.91 0.33		0.05 0.01
Liver	(g) (g%)	9.75 3.44		1.20 0.20		10.84 3.67		1.46 0.43	10.30 3.47		0.94 0.24	9.95 3.55		1.55 0.36
Kidneys	(g) (g%)	1.94 0.68		0.29 0.09		1.99 0.67		0.23 0.06	2.03 0.69		0.20 0.06	1.88 0.67		0.21 0.05
Spleen	(g) (g%)	0. 5 9 0. 2 1		0.10 0.03		0.62 0.21		0.02 0.02	0.69 0.23		0.16 0.04	0.60 0.21		0.13 0.04
Adrenal glands	(mg) (mg%)	65.9 23.5		7.0 3.6		76.1 25.8		14.6 5.0	68.4 23.1		7.8 2.4	75.0 26.9		6.4 3.1

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester

Values represent mean±S.D.

^a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

^{**} significantly different from control, p<0.01

Table 20

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

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

compound			PETI	<u> </u>
ose (mg/kg)		0ª		1000
<u> [ale</u>				
Number of animals		5		5
Terminal body weight	(g)	539.1 ±	54.2	548.2 ± 30.6
Brain	(g) (g%)	2.06 ± 0.38 ±	0.06 0.04	2.02 ± 0.08 0.37 ± 0.02
Thymus	(mg) (mg%)	226.7 ± 42.3 ±	23.7 5.1	$\begin{array}{cccc} 269.8 & \pm & 60.7 \\ 49.1 & \pm & 10.0 \end{array}$
Heart	(g) (g%)	1.49 ± 0.28 ±	0.10 0.01	1.50 ± 0.15 0.28 ± 0.02
Liver	(g) (g%)	14.80 ± 2.74 ±	2.06 0.13	$16.21 \pm 2.32 \\ 2.95 \pm 0.29$
Kidneys	(g) (g%)	3.45 ± 0.65 ±	0.11 0.05	3.49 ± 0.33 0.63 ± 0.03
Spleen	(g) (g%)	0.73 ± 0.13 ±	0.18 0.03	0.88 ± 0.14 0.16 ± 0.02
Adrenal glands	(mg) (mg%)	61.5 ± 11.4 ±	11.8 1.6	67.9 ± 10.2 12.4 ± 2.0
Testes	(g) (g%)	3.74 ± 0.70 ±	0.33 0.12	3.41 ± 0.12 0.62 ± 0.05
Epididymides	(g) (g%)	1.32 ± 0.25 ±	0.07 0.03	1.30 ± 0.03 0.24 ± 0.01
emale, satellite group			·	
Number of animals		5		5
Terminal body weight	(g)	281.6 ±	8.9	280.5 ± 18.4
Brain	(g) (g%)	1.89 ± 0.67 ±	0.10 0.02	$\begin{array}{ccc} 1.90 & \pm & 0.04 \\ 0.68 & \pm & 0.05 \end{array}$
Thymus	(mg) (mg%)	245.4 ± 87.1 ±	43.9 15.1	$261.9 \pm 50.7 \\ 93.8 \pm 19.6$
Heart	(g) (g%)	0.93 ± 0.33 ±	0.12 0.05	0.91 ± 0.05 0.33 ± 0.03
Liver	(g) (g%)	7.58 ± 2.69 ±	0.44 0.08	7.95 ± 0.64 2.83 ± 0.09 *
Kidneys	(g) (g%)	1.92 ± 0.68 ±		1.97 ± 0.25 0.71 ± 0.09
Spleen	(g) (g%)	0.48 ± 0.17 ±		0.52 ± 0.05 0.18 ± 0.02
Adrenal glands	(mg) (mg%)	66.8 ± 23.7 ±		65.6 ± 11.3 23.3 ± 3.1

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D.

^a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

^{*} significantly different from control, p<0.05

Table 21
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats
Macroscopic findings of males at the end of dosing period

Dose (Group)	Control (MX01-)	100 mg/kg (MX02-)	300 mg/kg (MX03-)	1000 mg/kg (MX04-)
Grade	- + 	- +	, +	- +
(All organs)	[7]	[12]	[12]	[7]
Abnormality	7 0	12 0	12 0	7 0

^{-,} Negative; +, Positive

^{[],} Number of animals examined

Table 22
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats
Macroscopic findings of females at the end of dosing period

Dose (Group)	Control (FB01-)	100 mg/kg (FB02-)	300 mg/kg (FB03-)	1000 mg/kg (FB04-)	
Grade	- +	- +	- +	- +	
(All organs) Abnormality	[12] 12 0	[12] 12 0	[12]	[12] 12 0	

^{-,} Negative; +, Positive

^{[],} Number of animals examined

Table 23

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

Dose (Group) Grade	Control (MX01-)	1000 mg/kg (MX04-) - +
(Bone of right femur) Mass	[5]	[5] 5 0

^{-,} Negative; +, Positive

^{[],} Number of animals examined

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

Dose (Group)	Control (FB05-)	1000 mg/kg (FB06-)			
Grade	- +	- +			
(All organs)	[5]	[5]			
Abnormality	5 0	5 0			

- -, Negative; +, Positive
- [], Number of animals examined

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

Dose (Group) Grade	Control (MX01-) $-\pm + +++$ Pos.	100 mg/kg (MX02-) - ± + ++ +++ Pos.	300 mg/kg (MX03-) — ± + ++ +++ Pos.	1000 mg/kg (MX04-) — ± + ++ +++ Pos.
(Testis)	[7]	[12]	[12]	[7]
Atrophy, seminiferous tubule, focal	7 0 0 0 0 0	9 2 1 0 0 3	11 1 0 0 0 1	7 0 0 0 0 0
(Epididymis)	[7]	[12]	[12]	[7]
Cell debris, lumen	7 0 0 0 0 0	10 1 1 0 0 2	11 1 0 0 0 1	7 0 0 0 0 0
(Liver)	[5]	[0]	[0]	[5]
Fatty change, hepatocyte, periportal	0 1 3 1 0 5			0 3 2 0 0 5
Microgranuloma	1 4 0 0 0 4			0 5 0 0 0 5
(Kidney)	[5]	[0]	[0]	[5]
Eosinophilic body				
proximal tubule, cortex	0 5 0 0 0 5			2 3 0 0 0 3
Basophilic tubule, cortex	3 2 0 0 0 2			1 4 0 0 0 4
(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 5 0 0 5
(Heart)	[5]	[0]	[0]	[5]
Degeneration/fibrosis,				
myocardium, focal	4 1 0 0 0 1			3 2 0 0 0 2
(Lung & Bronchus)	[5]	[0]	[0]	[5]
Accumulation, foam cell,				
focal, alveolus	4 1 0 0 0 1			2 3 0 0 0 3
Mineralization, arterial wall, lung	2 3 0 0 0 3			4 1 0 0 0 1
(Prostate)	[5]	[0]	[0]	[5]
Cellular infiltration, lymphocyte &				
neutrophil, epithelium/interstitium	3 1 1 0 0 2			3 1 0 1 0 2
(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				
(Trachea)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Thyroid gland)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester -, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade [], Number of animals examined

Table 25 (Continued)
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Histopathological findings of males at the end of dosing period

Dose (Group) Grade	Control (MX01-) - ± + ++ Pos.	100 mg/kg (MX02-) ± + ++ +++ Pos.	300 mg/kg (MX03-) ± + ++ +++ Pos.	1000 mg/kg (MX04-) — ± + ++ +++ Pos.
(Thymus)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change (Mandibular lymph node) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Stomach) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Duodenum) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Jejunum) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Ileum) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Cecum) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Colon) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Rectum) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Mesenteric lymph node) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Adrenal gland) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Sciatic nerve) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Urinary bladder) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Seminal vesicle & Coagulating gland) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]
(Bone marrow of femur) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-1-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester -, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade [], Number of animals examined

Table 26 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Histopathological findings of females at the end of dosing period

Dose (Group) Grade	Control (FB01-) - ± + ++ +++ Pos.	100 mg/kg (FB02-) — ± + ++ +++ Pos.	300 mg/kg (FB03-) - ± + ++ +++ Pos.	1000 mg/kg (FB04-) - ± + ++ +++ Pos.
Grade (Ovary) Cyst, follicular Increase, atrecia, follicle Decrease, corpus luteum (Liver) Fatty change, hepatocyte, periportal Microgranuloma (Kidney) Basophilic tubule, cortex Mineralization (Spleen) Hematopoiesis, extramedullary Deposit, pigment, brown (Heart) Degeneration/fibrosis, myocardium, focal (Lung & Bronchus) Mineralization, arterial wall, lung (Thymus) Atrophy (Brain) No remarkable change (Spinal cord)				
No remarkable change (Pituitary gland) No remarkable change (Trachea) No remarkable change (Thyroid gland) No remarkable change (Mandibular lymph node) No remarkable change	[5] [5] [5]	[0] [0] [0] [0]	[0] [0] [0]	[5] [5] [5]

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester -, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade [], Number of animals examined

Table 26 (Continued)
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Histopathological findings of females at the end of dosing period

Dose (Group) Grade	Control (FB01-) - ± + ++ +++ Pos.	100 mg/kg (FB02-) — ± + ++ +++ Pos.	300 mg/kg (FB03-) - ± + ++ +++ Pos.	1000 mg/kg (FB04-) s. — ± + ++ +++ Pos.		
(Stomach) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Duodenum) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Jejunum) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Ileum) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Cecum) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Colon) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Rectum) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Mesenteric lymph node) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Adrenal gland) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Sciatic nerve) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Urinary bladder) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Uterus) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Vagina) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		
(Bone marrow of femur) No remarkable change	[5]	[0]	[0]	[5]		

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester

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

Table 27
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats
Histopathological findings of males at the end of recovery period

Dose (Group) Grade	Control (MX01-) - ± + ++ +++ Pos.	1000 mg/kg (MX04-) - ± + ++ +++ Pos.
(Testis)	[5]	[5]
No remarkable change		
(Epididymis)	[5]	[5]
No remarkable change		
(Bone of right thigh)	[1]	[0]
Ossification, intramembranous\$	0 0 1 0 0 1	
Proliferation, periosteum ³	0 0 0 1 0 1	

^{-,} Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

^{[],} Number of animals examined

^{\$;} These histopathological findings are due to fracture of right femur.

Table 28 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Histopathological findings of females at the end of recovery period

Dose (Group) Grade	Control (FB05-) - ± + ++ +++ Pos.	1000 mg/kg (FB06-) - ± + ++ +++ Pos.
(Ovary) Cyst, follicular	5 0 0 0 0	[5]

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester –, 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 PETE by oral administration in rats

Estrous cycle of dams

Compound		PETE		
Dose (mg/kg)	0 ^a	100	300	1000
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	11	11	12
4/5-day cycle	0	0	1	. 0
5-day cycle	0	1	0	0
Frequency of animals of which type of estrus cycle				
was changed after the treatment	0 / 12	1 / 12	1 / 12	0 / 12
Mean times of vaginal estrus during meating period; mean \pm S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (12)	$1.1 \pm 0.3 (12)$	1.0 ± 0.0 (12)	$1.0 \pm 0.0 (12)$

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 30

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats
Reproductive performance of animals

Compound	PETE					
Dose (mg/kg)	o ^a	100	300	1000		
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	11		
Fertility index	100.0	100.0	100.0	91.7		
Pairing days until copulation; mean±S.D.	2.1 ± 1.0	2.9 ± 1.6	2.8 ± 1.1	3.4 ± 3.1		

Copulation index = (number of pairs copulated / number of pairs examined) \times 100, % Fertility index = (number of pregnant females / number of pairs copulated) \times 100, %

a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 31

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

Development of pups up to day 4 of lactation

Compound	PETE								
Dose (mg/kg)	o ^a	0 ^a 100			300		1000		
Number of pregnant females	12		12		12		11		
Number of pregnant females with live newborns	12		12		12		11		
Gestation index	100		100		100		100)	
Gestation length in days	22.5 ± 0	5 (12)	22.5 ± 0.5	(12)	22.3 ± 0.5	(12)	22.5 ±	0.5	(11)
Number of corpora lutea	16.4 ± 2	5 (12)	15.5 ± 1.7	(12)	15.8 ± 1.8	(12)	16.2 ±	1.0	(11)
Number of implantations	14.4 ± 2	8 (12)	15.3 ± 1.5	(12)	15.3 ± 1.7	(12)	15.5 ±	1.0	(11)
Implantation index	88.8 ± 18.	7 (12)	98.5 ± 3.5	(12)	97.0 ± 4.7	(12)	95.6 ±	5.2	(11)
Day 0 of lactation (at birth)									
Number of newborns	13.8 ± 2.	7 (12)	13.5 ± 2.4	(12)	14.3 ± 2.1	(12)	14.4 ±	1.3	(11)
Delivery index	96.2 ± 5.	0 (12)	88.4 ± 13.2	(12)	93.2 ± 6.8	(12)	93.0 ±	6.8	(11)
Number of live newborns	13.6 ± 2.	8 (12)	13.2 ± 2.4	(12)	14.2 ± 2.2	(12)	14.0 ±	1.6	(11)
Males	6.5 ± 2	7 (12)	7.3 ± 2.5	(12)	7.0 ± 2.5	(12)	6.4 ±	1.8	(11)
Females	7.1 ± 1.	8 (12)	5.9 ± 1.9	(12)	7.2 ± 1.6	(12)	7.6 ±	2.5	(11)
Birth index	94.6 ± 8.	1 (12)	86,3 ± 14.2	(12)	92.1 ± 6.7	(12)	90.5 ±	7.7	(11)
Live birth index	98.2 ± 4	5 (12)	97.7 ± 6.3	(12)	98.9 ± 3.8	(12)	97.3 ±	5.0	(11)
Sex ratio on day 0	45.5 ± 18.	, ,	53.9 ± 15.9	(12)	48.6 ± 12.5	(12)	46.0 ±	14.0	(11)
Day 4 of lactation									
Number of live pups	13.4 ± 3.4	0 (12)	13.1 ± 2.5	(12)	14.1 ± 2.2	(12)	13.7 ±	1.6	(11)
Males	6.4 ± 2	8 (12)	7.2 ± 2.4	(12)	7.0 ± 2.5	(12)	6.3 ±	1.8	(11)
Females	7.0 ± 1.	9 (12)	5.9 ± 1.9	(12)	7.1 ± 1.6	(12)	7.5 ±	2.4	(11)
Viability index	98.6 ± 4.	` '	99.4 ± 2.2	(12)	99.4 ± 2.2	(12)	98.2 ±	4.5	(11)
Sex ratio on day 4	45.4 ± 18.	• •	53.8 ± 15.6	(12)	48.8 ± 12.3	(12)	46.2 ±	14.1	(11)

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) \times 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) \times 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, %

Values represent mean±S.D. (N)

^a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 32
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administation in rats
Mean body weight of pups up to day 4 of lactation

Compound	PETE					
Dose (mg/kg)	0 ^a	100	300	1000		
Day 0 of lactation						
Number of live newborns						
Male	$6.5 \pm 2.7 (12)$	7.3 ± 2.5 (12)	7.0 ± 2.5 (12)	6.4 ± 1.8 (11)		
Female	$7.1 \pm 1.8 $ (12)	5.9 ± 1.9 (12)	7.2 ± 1.6 (12)	$7.6 \pm 2.5 (11)$		
Mean body weight (g)						
Male	$6.6 \pm 0.5 (11)$	7.1 ± 0.8 (12)	6.7 ± 0.9 (12)	$6.7 \pm 0.6 (11)$		
Female	$6.4 \pm 0.6 (12)$	6.7 ± 0.8 (12)	6.3 ± 0.8 (12)	$6.3 \pm 0.5 $ (11)		
Day 4 of lactation						
Number of live newborns						
Male	$6.4 \pm 2.8 (12)$	7.2 ± 2.4 (12)	7.0 ± 2.5 (12)	$6.3 \pm 1.8 (11)$		
Female	$7.0 \pm 1.9 $ (12)	5.9 ± 1.9 (12)	7.1 ± 1.6 (12)	$7.5 \pm 2.4 (11)$		
Mean body weight (g)						
Male	$10.6 \pm 0.8 (11)$	11.7 ± 2.0 (12)	10.6 ± 1.6 (12)	$10.5 \pm 1.2 (11)$		
Female	$10.7 \pm 1.4 $ (12)	11.2 ± 1.9 (12)	10.1 ± 1.6 (12)	$10.0 \pm 1.1 (11)$		

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester Values represent mean±S.D. (N)

a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 33 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of PETE by oral administration in rats Morphological observations of pups

Compound	PETE					
Dose (mg/kg)	o ^a	100	300	1000	000	
Dead pups						
Number of dead pups b	5	5	3	7		
Number of missing pups	0	0	1	3		
Number of dead pups examined	5 (3)°	5 (4)	2	4		
No. of dead pups with external changes	0	0	0	0		
No. of dead pups with visceral changes	0	0	0	0		
<u>Live pups</u> Number of newborns examined (Day 0 of lactation; at birth)	163	158	170	154		
No. of newborns with external changes	0	0	0	1		
Types and number Kinked tail	0	0	0	I		
Number of pups examined (Day 4 of lactation; at necropsy)	161	157	169	151		
No. of pups with external changes	0	0	.0	0		
No. of pups with visceral changes	0	0	0	0		

PETE:hexanoic acid, 2-ethyl-, 2,2-bis[[(2-ethyl-l-oxohexyl)oxy]methyl]-1,3-propanediyl ester a vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

b including missing pups

[°] parenthesis indicates number of dead pups with rotten internal organs