

1,1,1-トリス (ヒドロキシメチル) エタンのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

厚生省 生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター 秦 野 研 究 所

【目次】

			貝
要	彩	j	1
緒	1		3
試	験材	†料および方法	4
	1.	被験物質	4
	2.	使用動物および飼育条件	4
	3.	群分け法および個体識別	5
	4.	投与量、群構成、投与期間および投与方法	5
	5.	観察方法	6
1	6.	統計解析	9
結	集	Į	11
I.	反	〔復投与毒性(親動物所見)····································	11
	1.	一般状態	11
	2.	体重	11
,	3.	摂餌量	12
	4.	解剖時検査所見	12
Ι.	生	:殖発生毒性	15
	1.	生殖関連所見	15
4	2.	出生児所見	15
考	察		17
文	献	<i>\</i>	19

Figures (Figure 1 \sim Figure 4)

Tables (Table 1 \sim Table 24)

1.1.1-トリス (ヒドロキシメチル) エタン (THA と略記) の 0 (溶媒対照)、100、300 および 1000 mg/kg を Sprague-Dawley 系 (Crj:CD) ラットの雌雄 (各13匹/群) に、交配前 2 週間および交配期間 2 週間経口投与した。さらに、雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育 3 日まで投与を継続して、THA の親動物に対する反復投与毒性および生殖能力、ならびに次世代児の発生・発育に及ばす影響について検討した。

I. 反復投与毒性(親動物所見)

1. 雄動物

1000 mg/kg の投与量の THA を反復投与しても一般状態、体重増加および摂餌量に変化は認められなかった。

42回反復投与後に実施した、器官重量測定、病理学検査および血液学検査の各成績に投与の影響は認められなかったが、血液生化学検査において 1000 mg/kg 投与群のGOTおよびGPT活性が上昇し、ブドウ糖濃度が低下したことから、THA 投与は肝臓に影響を及ぼす可能性があるものと推測された。

2. 雌動物

1000 mg/kg の投与量の THA を最長44回反復投与しても一般状態および摂餌量に変化は 認められなかったが、妊娠期間中の体重増加が抑制された。その他の時期の体重増加およ び哺育4日における器官重量ならびに病理学検査には投与の影響は認められなかった。



Ⅱ. 生殖発生毒性

1. 生殖関連所見

1000 mg/kg までの THA は、交尾、排卵および受胎に影響を示さなかった。また、THA 投与に起因する分娩異常および哺育状態の異常はいずれの投与群にも認められなかった。

2. 出生児所見

出生児の生存性、性比および体重に THA 投与の影響は認められず、THA 投与に起

因した形態異常も観察されなかった。

Ⅲ. 評価

以上の試験成績から、本試験条件下では、THA の反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄いずれの動物に対しても 300 mg/kg/day であり、生殖・発生毒性に関する無影響量は、1000 mg/kg/day 以上であると結論される。

【緒言】

THA は、3価のオキシメチル基を含む炭化水素で、その毒性については公表されていない。「1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタンのラットを用いる単回投与毒性試験」(以下、単回投与試験)において、OBCD化学物質毒性試験法ガイドラインにおける単回投与試験の限度量 2000 mg/kg をラットに経口投与したが、一般状態の異常および死亡は認められなかった。本試験では、OBCD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として THA の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(以下、併合試験)を行い、同化合物の雌雄ラットに及ぼす反復投与毒性ならびに生殖・発生毒性について検討したのでその結果を報告する。

【試験材料および方法】

1. 被験物質

1,1,1-トリス (ヒドロキシメチル) エタン (THAと略記) [CAS No.: 77-85-0; 分子式: C₅H₁₂O₃; 分子量: 120.15; 英名: 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane; 融点: 200℃; 沸点: 283℃/1176 mmHg) は、オキシメチルを3分子含む炭化水素である。

併合試験に使用した THA (ロット番号: 純度: 99.0wt% (主な不純物: ビス (2,2-ジメチロールプロピル) エーテル 0.1%、ビス (2,2-ジメチロール) プロポキシメタン 0.3%、ペンタエリスリトール 0.3%、水分 0.14%) (Annex 1)] は、白色固体で、使用時まで室温で保管し、日局注射用水 (DW と略記:光製薬㈱、製造番号:9609CA) に溶解して、いずれの用量においても1回の投与液量が5mL/kg 体重になるように含量を調整した。調製液は、冷蔵保管し、調製後7日以内に投与した。調製液中の被験物質は、冷蔵条件下で少なくとも8日間安定であることが併合試験に先立って実施された単回投与毒性試験において確認されている (Annex 2)。また、本試験において調製された投与検体には、所定量の THA が含有されていたこと

2. 使用動物および飼育条件

を確認した(Annex 3)。

試験には、雌雄ともに7週齢で購入した日本チャールス・リバー㈱日野飼育センター生産の Sprague-Dawley 系ラット (Crj:CD、SPF) を使用した。購入した動物は、入荷後6日間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、その間のいずれの動物にも一般状態に異常が認められなかったので、これを試験に供した。動物の入荷、検疫ならびに群分け状況は、Annex 4 に示した。

各動物は、基準温湿度各24±1°C、および50~65%、換気回数約15回/時間、照明12時間(午前7時~午後7時)に制御された飼育室(3号室)で、金属製ケージ(220w×270d×190h mm、日本ケージ㈱)に個別に収容して飼育し、固型飼料(CE-2、日本クレア(株))および飲料水(水道水、秦野市水道局給水)を自由に摂取させた。妊娠14日(精子確認日=妊娠0日)以後の母動物は、ラット用繁殖ケージ(350×400×180 mm、日本クレア(株))に収容し、床敷として紙パルプ製チップ(ALPHA-dri、加商㈱)を適宜供給した。

試験期間中、秦野研究所中央コントロール室において測定した飼育室の室温および相対

湿度は、それぞれ、23.8~25.4℃、および52~69%と許容範囲内であり、使用した飼料、 水および床敷には試験に支障を来す可能性の考えられる混入物はなかったことが確認され ている。

3. 群分け法および個体識別

雌雄とも初回投与日(投与1日)の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けし、1群につき各13匹を用意した。これらすべての親動物は、尾に油性フェルトペンで群および個体番号を記して個体識別した。各飼育ケージには、個体番号等の必要事項を記入した、群ごとに色彩の異なるカードを掛けて個体識別の補助とした。なお、出生児は、個体を識別しなかった。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験と同系統のラット各群雌雄5匹に、THAの0 (DW、5 mL/kg)、250 mg/kg、500 mg/kg および 1000 mg/kg を8 週齢から14日間連日経口投与した予備試験 (試験計画番号: R-96-003) において、1000 mg/kg 投与により雌雄動物の体重増加が軽度に抑制される傾向が認められたが、500 mg/kg および 250 mg/kg 投与では異常が認められなかった。そこで、併合試験における最高用量にも 1000 mg/kg を設定し、用量依存関係を明瞭にするためにこれを公比約3で減じ、中用量には 300 mg/kg、低用量には 100 mg/kg を設定した。対照群のラットには、THAの媒体とした DW を THA 投与群と同一条件で投与した。以下に群構成を示す。

*** ***	1-1-EA 14-1-19	+1. = = .	匹数(動物署	号)
群番号	被験物質	投与量 (mg/kg)	雄	堆
1	溶媒対照(DW)	0	13 (MX01001-013)	13 (FB01001-013)
2	THA	100	13 (MX02001-013)	13 (FB02001-013)
3	THA	300	13 (MX03001-013)	13 (FB03001-013)
4	THA	1000	13 (MX04001-013)	13 (FB04001-013)

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了 後14日間の連続42日間、また、雌に対しては交配前14日間と最長14日間の交配期間中(交 尾まで)ならびに交尾した雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日(分娩日=哺育0日)まで毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した。毎日の投与は、原則として一定時刻の間(通常9時~12時)に行い、各動物の投与液量(5 mL/kg)は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重をもとに、また、交尾後の雌については妊娠0日(交尾確認日)の体重をもとにそれぞれ算出した。

5. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態の観察

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日1回以上観察した。

B. 体重測定

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週1回〔雄:投与1、8、15、22、29、36、42日、雌:投与1、8、15日〕および剖検日に測定した。投与29日までに交尾しなかった 雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾した雌では、妊娠0、7、14、20日に、 さらに、分娩した雌では、哺育0および4日の体重を測定した。

C. 摂餌量測定

雌雄とも、全例について体重測定日と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算出した。2週間の交配期間中は摂餌量を測定しなかった。交尾した雌では、妊娠0~7、7~14、14~20日の、さらに、分娩した雌では、哺育0~4日の摂餌量を測定した。

D. 交配

交配は、投与15日の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。 交尾成立の確認は、毎朝、腟栓および腟垢標本を作製して標本中の精子の存在を調べるこ とにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別 に飼育した。交配結果から、各群について交尾率〔(交尾動物数/交配動物数)×100〕、 受胎率〔(受胎動物数/交尾動物数)×100〕、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を求めた。

E. 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た。分娩状態は直接観察が可能であったものについてのみ行った。また、直接観察が可能でなかった例においても分娩後の徴候から

分娩状態の良否が判定できるものについては、それを記録した。分娩後は哺育状態を観察 し、異常の有無を記録した。

F. 分娩日の規定

分娩の確認は、午前9時~11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認 した動物について、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩を終了した動物に ついては、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を算定し、出産率 [(生児出産雌数/受胎動物数)×100)を各群について求めた。

- G. 剖検
- a) 雄動物
- 1. 血液学検査

全例について最終投与日に絶食を開始し、その翌日(絶食開始18~24時間後)にペント バルビタール麻酔下で腹部後大静脈より EDTA-2K を抗凝固剤として採血し、次の項目に ついて検査した。

項	目	測	定	法	使	用	機	器
赤血球数	(RBC)	自動	(電気抵	抗法)	Coulter PLUS IV			Model S-
白血球数	(WBC)	"	(")	1200 2,	"	,	, , , , , ,
血色素量		"	(吸光度	法)		"		
	球容積 (MCV)	"	(電気抵	抗法)		"		
血小板数		"	(")		"		
ヘマトク	リット値(Ht)	計算	(RBC×M	$CV \times 0.001$	l)			
平均赤血I	球血色素量(MCH)	"	$(Hb \times 10$	00/RBC)				
平均赤血	球血色素濃度(MCHO	C) "	$(Hb \times 10)$	0/Ht)				
白血球分類	類		静脈血塗 -Giemsa		光学顕微	鏡		

口. 血液生化学検査

全例について、血液検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、 それぞれ血漿を分離して次頁の項目について検査を行った。

項目		測	定	法	使 用 機 器	
総蛋白濃度	ť	ウレット	法		遠心方式生化学自動分析装置	: [
アルブミン濃度	В	CG法			COBAS- FARA(ロシュ) "	
総コレステロール濃		$OD \cdot D$	AOS	法	<i>"</i>	
トリグリセライド濃		$PO \cdot D$			<i>"</i>	
ブドウ糖濃度		ルコキナ			"	
尿素窒素濃度(BUN)		レアーゼ		法	<i>"</i>	
クレアチニン濃度		ffé 法(序设 4	// //	
アルカリフォスファ 活性(ALP)	· 9 - 10 /19.	ニトロフェニルリ	/)) () ()	【公	"	
GOT活性	S	SCC法	:		<i>"</i>	
ĞPT活性		SCC法			<i>"</i>	
総ビリルビン濃度		ルビン「ロシュ」		-ズ	<i>"</i>	
カルシウム濃度		CPC法			//	
ナトリウム濃度	イ	オン電極	法		全自動電解質分析装置 EA05	
カリウム濃度	,	オン電極	:> : :		(A&T)	
カッツム候及 塩素濃度		々 ノ 电極 オン電極			"	
無機リン濃度		リブデン		法	遠心方式生化学自動分析装置	L L
(Inorg. phos.)			~~~		COBAS- FARA (ロシュ)	•
γ – G T P 活性		ーグルタミルー3	}ーカルボキシ	-4-二107.	ニリド ツ	
A (011)		質法				
A/G比	計:	异 				

ハ. 病理学検査

全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。その際、肝臓、腎臓、胸腺、精巣および精巣上体の重量を測定し、併せて比体重値(相対重量)を算出した。これらの器官のうち、精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存し、その他の器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱は、10%ホルマリンに固定して保存した。これらの器官は高用量群および対照群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリンーエオジン染色を行って病理組織学検査を行った。また、これらの器官以外で剖検時に異常の観察された器官は、10%ホルマリンに固定して保存したが、いずれも投与に関連した変化ではないと判断されたので、病理組織学検査は実施しなかった。

b) 雌動物

分娩しない雌は妊娠25日相当日に致死量のペントバルビタールを投与後に放血・致死させ、剖検した。また、分娩した雌は哺育4日に同様にして剖検した。妊・不妊のいずれの例においても卵巣および子宮を摘出し、子宮については着床数を数え、着床の認められた動物を受胎例とした。卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数え、ブアン液に固定して保存した。不妊例の卵巣については、病理組織学検査を行った。また、肝臓、腎臓および胸腺の重量を全例について測定し、脳、心臓、脾臓、副腎、子宮、膀胱とともに10%ホルマリ

ンに固定して保存した。これらの器官は高用量群および対照群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリンーエオジン染色を行って病理組織学検査を行った。これらの器官以外で剖検時に異常が観察された器官も、10%ホルマリンに固定して保存したが、いずれも投与に関連した変化であると判断されなかったので、病理組織学検査は実施しなかった。

2) 出生児

A. 産児数の算定

哺育 0 日に産児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率〔(産児数/着床痕数)×100〕および生児出産率〔(出産生児数/着床痕数)×100〕を求めた。また、産児の外表 奇形の有無および性別を調べ、生存児の性比〔(雄の生児数/出産生児数)×100〕を 算出した。

B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、出生率 ((出産生児数/産児数) × 100)、新生児の哺育 4 日の生存率 ((哺育 4 日の生児数/哺育 0 日の生児数) × 100) および哺育 4 日における性比 ((雄の生児数/生児数) × 100) を求めた。死亡児は剖検し、異常の有無、外表および内部器官の肉眼的観察を行った。

C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重(litter 重量)を測定し、 (litter 重量/測定児数)を各腹について求めた。

D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させて剖検し、外表および内部器官の肉眼的 観察を実施した。

6. 統計解析

交尾率および受胎率については Yates の補正を含む χ^2 検定を行った。病理組織 学所見については、グレード分けしたデータについては Mann-Whitney のU検定 $^{1,2)}$ を用 いて検定し、陽性グレードの合計値については Fisher 直接確率の片側検定 $^{2)}$ で行った。 その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を 1 標本として、 各群の分散が 0 より大きい場合は、先ず、8 art lett 法 3 により各群の分散の一様性

について検定した。その結果、分散が一様とされた場合には、一元配置型の分散分析⁸⁾を行い、群間に有意性が認められた場合には Dunnett 法⁴⁾あるいは Scheffé 法⁵⁾により対照群と THA 各投与群との間で平均値の差の検定を行った。分散が一様でなかった場合、および分散が 0 となる群が存在するときは、Kruskal-Wallis 順位検定⁶⁾を行い、群間に有意性が認められた場合に、対照群と THA 各投与群との差について Dunnett 法⁴⁾あるいは Scheffé 法⁵⁾の検定を行った。有意水準は5%および1%とした。

I. 反復投与毒性(親動物所見)

1. 一般状態

雌雄ともにいずれの投与群にも死亡あるいは瀕死動物は認められなかった。 いずれの投与群においても、雄には一般状態の異常は認められなかった。

雌では、1000 mg/kg 投与群の1例(個体番号 FB04001)の腰部に投与28日から剖検 日まで貧毛が観察された。その他の動物については、いずれの投与群も一般状態の異常は 観察されなかった。

2. 体重

1) 雄 (Figure 1; Tables 1、2; Appendices 1-1~2-4) いずれの THA 投与群の体重推移にも、投与の影響は認められなかった。

2) 雌 (Figure 2)

- (1) 交配前 (Tables 3、4; Appendices 3-1~4-4)
- 300 mg/kg 投与群の投与8~15日の増加量および投与15日までの累積増加量は対照群と 比較して有意 (p<0.05) に増加した。しかし、その他の THA 投与群の体重は、対照 群と同様に推移した。
 - (2) 妊娠期 (Tables 5、6: Appendices 5-1~6-4)
- 300 mg/kg 以下の投与群の体重増加は、妊娠期を通して対照群と同様であった。1000 mg/kg 投与群では、妊娠期の体重増加に抑制が認められ、妊娠20日の体重、妊娠7~14日の増加量および妊娠20日までの累積増加量が対照群と比較して有意(p<0.05、p<0.01)に低い値を示した。
 - (3) 哺育期 (Tables 7、8; Appendices 7-1~8-4)
- 300 mg/kg 投与群の哺育 4 日の体重が、対照群と比較して有意 (p<0.05) に高い値を示したが増加量については対照群との間に有意差はなかった。その他の THA 投与群の体重増加については対照群と同様であった。

3. 摂餌量

- 1) 雄 (Figure 3; Table 9; Appendices 9-1~9-4) いずれの THA 投与群にも対照群との間で有意差は認められなかった。
- 2) 雌 (Figure 4; Tables 10~12; Appendices 10-1~12-4)

交配前、妊娠期および哺育期を通じて、いずれの時期の摂餌量も対照群と THA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

4. 解剖時檢查所見

1)雄

(1) 血液学検査所見 (Table 13; Appendices 13-1~13-4)

100 mg/kg 投与群では、いずれの項目にも対照群との間に有意差は認められなかった。 300 mg/kg 以上の投与群で平均血色素濃度が対照群と比較して有意な低値(p<0.05、p<0.01)を示したが、THA の投与量に依存した変化ではなかった。このほか、1000 mg/kg 投与群においてヘマトクリット値が、対照群と比較して有意(p<0.05)に増加した。白血球百分比については、300 mg/kg 投与群において分節核好中球が対照群と比較して有意(p<0.01)に増加し、リンパ球が 300 mg/kg 以上の投与群で有意(p<0.05、p<0.01)に減少したが、いずれも THA の用量に依存した変化ではなかった。その他の項目には対照群と THA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

(2) 血液生化学検査所見(Table 14: Appendices 14-1~14-4)

対照群と比較して 1000 mg/kg 投与群において総蛋白濃度、ナトリウム濃度が、有意 (p<0.05、p<0.01) に増加し、GOT活性およびGPT活性も有意 (p<0.05、p<0.01) に上昇した。一方、ブドウ糖濃度およびカリウム濃度は有意 (p<0.01) に減少した。また、 γ -GTP活性は僅少差ではあるが、300 mg/kg 以上の投与群において対照群と比較して有意 (p<0.05) に増加した。この他、THA の用量に依存した変化ではないが、対照群と比較して、A/G比が 100 mg/kg 投与群において有意 (p<0.05) に増加し、クレアチニン濃度が 100 mg/kg および 1000 mg/kg 投与群で有意 (p<0.05) に減少し、塩素濃度が THA 各投与群で有意 (p<0.05、p<0.01) に増加した。

(3) 剖検所見 (Table 15; Appendix 15)

以下の所見が観察されたが、いずれも THA の用量に依存した変化はなかった。

脳では、対照群の1例の大脳皮質の一部に陥凹部が認められた。肝臓では、300 および 1000 mg/kg 投与群に淡色域が、300 mg/kg 投与群に黒色の帯状斑がそれぞれ1例認められ、対照群の2例に小葉像の明瞭化が認められた。また、腎臓では、対照群の1例に皮髓境界部に暗色点が、100 mg/kg 投与群の1例に腎臓の陥凹部が認められた。100 mg/kg 投与群では精巣上体の結節も1例にみられた。その他、肺では暗赤色域、暗褐色あるいは暗赤色点が各群に1例ずつ、精嚢では小型化が対照群に1例認められた。

(4) 器官重量 (Table 16: Appendices 16-1~16-4)

100 mg/kg 投与群において肝臓重量およびその比体重値が対照群と比較して有意(p< 0.05、p<0.01)に減少したが、その他の器官重量および比体重値については対照群との間に有意差は認められなかった。また、300 mg/kg 以上の投与群の器官重量および比体重値については、対照群との間に有意差は認められなかった。

(5) 病理組織学検査所見 (Table 17; Appendix 17)

脳、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、精巣および精巣上体に以下の所見が観察されたが、いずれも、1000 mg/kg 投与群と対照群との間で頻度あるいは程度に差は認められなかった。また、胸腺、副腎および膀胱には、異常は認められなかった。

(脳)

肉眼的に大脳皮質の一部に陥凹部が認められた対照群の動物の脳では、皮質の一側に先 天性と考えられる欠損部が確認された。

(肝臓)

対照群および 1000 mg/kg 投与群の全例に門脈周辺性の肝細胞の脂肪変性が、また、両投与群のほぼ全例に小肉芽腫が観察された。この他、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各1例に出血を伴う限局性の壊死巣が認められ、1000 mg/kg 投与群の他の例に被膜の限局性の線維化が観察された。

(腎臓)

対照群の7例、1000 mg/kg 投与群の6例に eosinophilic body が認められ、両群に好塩基性の尿細管がみられた。その他、対照群に腎盂の拡張、皮髄境界部の硝子円柱が観察された。

(心臓)

対照群および 1000 mg/kg 投与群に限局性の心筋変性あるいは線維化がそれぞれ 1 例観察された。

(脾臓)

対照群および 1000 mg/kg 投与群の全例に髄外造血および褐色色素の沈着が観察された。 (精巣および精巣上体)

1000 mg/kg 投与群の1例には、精巣に限局性の精細管の萎縮、精巣上体の管腔内に細胞残屑が観察された。

2) 雌

(1) 剖検所見 (Table 18; Appendix 18)

以下の所見が観察されたが、いずれもTHAの用量に依存した変化ではなかった。

腎臓では、300 mg/kg 投与群の1例に陥凹部が、対照群の1例に腎盂の拡張が認められた。胸腺では、100 および 300 mg/kg 投与群の各1例に赤色化が、対照群の3例、100、300 および 1000 mg/kg 投与群の各1例に小型化が認められた。その他、肺では、100 mg/kg 投与群に暗赤色化を伴う小型化が、腺胃では対照群に白色点、100 mg/kg 投与群に暗色点がそれぞれ1例みられた。

(2) 器官重量

a) 哺育4日剖検例 (Table 19-1; Appendices 19-1~19-4)

300 mg/kg 投与群において剖検時の体重が対照群と比較して有意(p<0.05)に高い値を示したが、各器官の重量および比体重値には対照群と THA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

b) 不妊例 (Table 19-2)

妊娠25日相当日に剖検した不妊動物の器官の重量および比体重値に、THA 投与に関連した変化は認められなかった。

(3) 病理組織学検査所見 (Table 20; Appendix 20)

肝臓、腎臓、脾臓および胸腺に以下の所見が観察されたが、いずれも、1000 mg/kg 投与群と対照群との間で頻度あるいは程度に差は認められなかった。また、脳、心臓、副 腎、膀胱および不妊例の卵巣には異常は認められなかった。

(肝臓)

対照群および 1000 mg/kg 投与群の多くの例に門脈周辺性の肝細胞の脂肪変性および小肉芽腫が観察された。

(腎臓)

対照群の 4 例、1000 mg/kg 投与群の 6 例に好塩基性の尿細管が観察された。

(脾臟)

対照群および 1000 mg/kg 投与群の全例に髄外造血および褐色色素の沈着が観察された。

(胸腺)

対照群の7例、1000 mg/kg 投与群の4例に萎縮が観察された。

Ⅱ. 生殖発生毒性

- 1. 生殖関連所見
- 1) 交配成績 (Table 21; Appendices 21-1~21-4)

交尾率および同居開始から交尾成立までに要した日数ならびにその間に回帰した発情期の回数に、対照群と THA 各投与群との間で有意差は認められなかった。受胎率については、300 mg/kg 投与群が低値の傾向を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 分娩および哺育状態

観察が可能であった動物については、分娩状態の異常は観察されなかった。 哺育状態の異常は、いずれの動物にも認められなかった。

3) 出産率および妊娠期間 (Table 22; Appendices 22-1~22-4) 出産率および妊娠期間に対照群と THA 各投与群の間で有意差は認められなかった。

4) 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 22; Appendices 22-1~22-4) 妊娠黄体数、着床数および着床率に対照群と THA 各投与群の間で有意差は認められ

2. 出生児所見

なかった。

1) 生存性(Table 22; Appendices 22-1~22-4)

産児数、分娩率、生児出産率、出生率および新生児の哺育4日の生存率には THA 各投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。また、性比についても対照群と

THA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 体重 (Table 23; Appendices 23-1~23-4)

THA 各投与群の雌雄出生児の体重は、哺育 0 日および 4 日のいずれも対照群と比較して高値の傾向が認められ、1000 mg/kg 投与群の哺育 4 日における雄の体重については、対照群との間に有意差 (p<0,05) も認められた。

3) 形態 (Table 24)

哺育 0 日に実施した産児の外表観察では、いずれの動物にも異常は観察されなかった (表には示さず)。

哺育4日における出生児の剖検においても、いずれの投与群の出生児にも異常は認められなかった。

死亡児の剖検でも、異常はいずれの投与群にも認められなかった(表には示さず)。

THA の 0 、100 、300 あるいは 1000 mg/kg を、雄には42日間、雌には交配前 2 週間か ら、交配期間、妊娠期間および哺育3日まで反復経口投与したが、雄については、一般状 態ならびにその間に測定した体重および摂餌量には、THA 投与による影響は認められなか った。また、投与期間終了後の剖検においても、器官重量、解剖所見、病理組織学検査所 見のいずれにも THA 投与による影響は認められなかった。血液学検査では、1000 mg/ kg 投与群のヘマトクリット値がやや増加した。同群では、対照群との間に有意差は なかったが、赤血球数および平均赤血球容積が僅かずつ増加していることから、ヘマトク リット値の増加は、その算定の基礎となる測定値の僅かな増加が相加された結果であると 考えられる。しかし、病理組織学検査および血液生化学検査において造血系の異常あるい は脱水に関連する腎機能の変化などは認められなかったことから、赤血球数および平均赤 血球容積の僅かな増加は偶発的変化であると考えられる。血液生化学検査では、THA の用 量に依存した変化として、総蛋白濃度、ナトリウム濃度、ならびにGPTおよびGOT活 性の上昇、ブドウ糖濃度およびカリウム濃度の低下が認められた。肝臓の重量および病理 組織学所見のいずれにも肝臓障害を示唆する変化は認められなかったが、GPTおよ びGOT活性の上昇、ならびにブドウ糖濃度の低下は肝機能障害を疑わせる。従って、 THA 投与は肝臓障害を引き起こす可能性があるものと推測される。総蛋白濃度およびナト リウム濃度の上昇ならびにカリウム濃度の低下については、数値の変動がごく僅かである ことから、THA 投与による影響は疑わしい。従って、雄に対する THA の反復投与毒性 に関する無影響量は 300 mg/kg/day であると推定される。

雌においても、一般状態ならびにその間に測定した摂餌量には、THA 投与による影響は認められなかった。しかし、体重については、1000 mg/kg 投与群において妊娠期間中、とくに妊娠中期の体重増加が抑制された。妊娠期間中の体重増加は、胎児の数とその発育に負うところが大きい。しかし、1000 mg/kg 投与群において妊娠 7~14日あるいは妊娠 0~20日の体重増加量が低値であった動物の哺育 0日の litter 重量あるいは産児数(Appendices 22-4、23-4)は、4 匹しか分娩しなかった 1 例を除き、必ずしも低値の傾向は示していない。従って、1000 mg/kg 投与群における妊娠期間中の体重増加抑制は、胎児の数あるいは発育に起因した変化であるよりも、THA の母動物に対する直接的な影響である可能性が高いと考えられる。しかし、これは妊娠期間中のみの

一過性の変化であると考えられる。投与期間終了後の剖検では、器官重量、解剖所見、病理組織学所見のいずれにも THA 投与による影響は認められなかった。これらのことから、雌に対する THA の反復投与毒性に関する無影響量は 300 mg/kg/day であると推定される。

投与動物の生殖能力については、いずれの投与群も全例の交尾が成立した。受胎率については300 mg/kg 投与群がやや低い傾向を示したが、1000 mg/kg 投与群は対照群と同率であり、THA の投与量に依存した変化ではなかった。また、生殖器官の重量および形態にも異常は認められなかった。従って、THA 投与は交尾および受胎能力に影響を及ぼさないものと考えられる。また、妊娠期間ならびに分娩および哺育観察の結果から、THA 投与は分娩および哺育に影響を及ぼさないものと考えられる。

発生毒性については、前述のように、1000 mg/kg 投与群には産児数の少ない litter が 1 例認められたが、この 1 例以外の産児数は12~16匹と正常な値であった。また、産児数、分娩率および生児出産率のいずれにも、THA 各投与群と対照群との間で有意差は認められず、形態異常を示す産児も観察されなかったことから、1000 mg/kg までのTHA は胎児の発生に影響を及ぼさないものと考えられる。出生児については、THA 各投与群の哺育0 日および 4 日における雌雄体重が対照群と比較して高値の傾向を示し、1000 mg/kg 投与群では哺育 4 日における雄の体重に有意差が認められた。しかし、litter 重量については哺育 0 日および 4 日のいずれの時期も対照群と差のない値であったことから、出生児体重の増加傾向は、生児数の僅かな変化に起因した偶発的変化であると考えられる。出生率、および新生児の哺育 4 日の生存率には THA 各投与群と対照群との間で有意差が認められなかった。これらのことから、1000 mg/kg までの THA は、出生児の発育に影響を及ばさないものと考えられ、THA の生殖発生毒性に関する無影響量は 1000 mg/kg/day であると推定される。

以上の成績から、本試験条件下では、反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄いずれの動物に対しても 300 mg/kg/day であり、生殖発生毒性に関する無影響量は 1000 mg/kg/day であると推察される。

- 1) 丹後俊郎: 医学への統計学(古川俊之 監修)、朝倉書店、東京(1985)
- 2) 石居 進:生物統計学入門、培風館、東京(1992)
- 3) 佐久間昭:薬効評価-計画と解析、東京大学出版会、東京(1977)
- 4) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491 (1964)
- 5) Scheffé, H.: A method for judging all contrasts in the analysis of variance. Biometrika, 40: 87-104 (1953)
- 6) Kruskal, W. H., W. A. Wallis: Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Assoc., 47: 583-621 (1952)

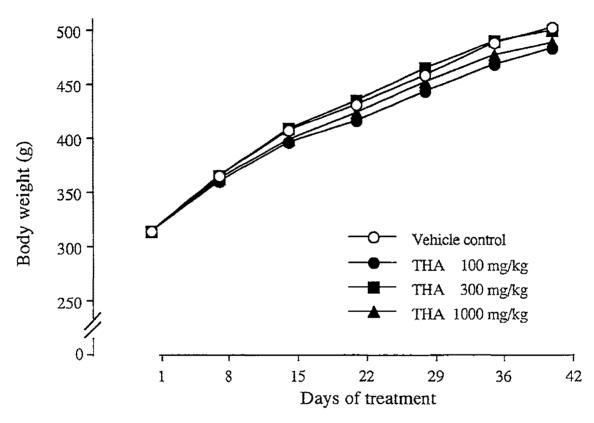


Fig. 1 Mean body weight of males

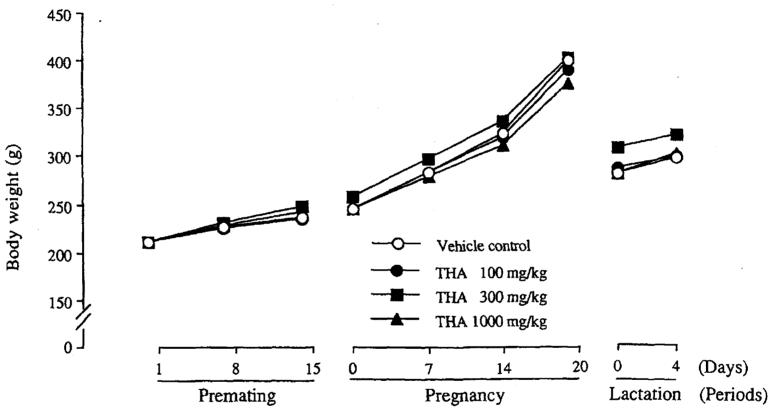


Fig. 2 Mean body weight of females

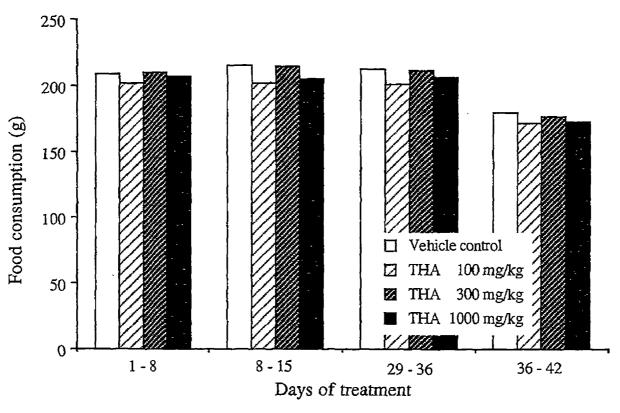


Fig. 3 Mean food consumption of males

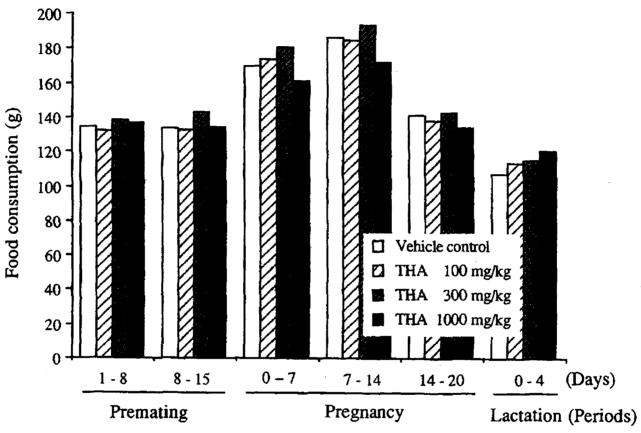


Fig. 4 Mean food consumption of females

[TABLE INDEX]

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

TABLE No.	(APPENDIX No.)	TABLE TITLE
1	(1-1 ~ 1-4)	Body weight of Fo males
2	(2-1 ~ 2-4)	Body weight gain of Fo males
3	(3-1 ~ 3-4)	Body weight of Fo females during pre-mating period
4	(4-1 ~ 4-4)	Body weight gain of Fo females during pre-mating period
5	(5-1 ~ 5-4)	Body weight of Fo females during pregnancy period
6	(6-1 ~ 6-4)	Body weight gain of Fo females during pregnancy period
7	(7-1 ~ 7-4)	Body weight of Fo females during lactation period
8	(8-1 ~ 8-4)	Body weight gain of Fo females during lactation period
9	(9-1 ~ 9-4)	Food consumption of Po males
10	(10-1 ~10-4)	Food consumption of Fo females during pre-mating period
11	(11-1 ~11-4)	Food consumption of F_{o} females during pregnancy period
12	(12-1 ~12-4)	Food consumption of Fo females during lactation period
13	(13-1 ~13-4)	Hematological findings of Fo males after oral administration for 42 days
14	(14-1 ~14-4)	Biochemical findings of Fo males after oral administration for 42 days
15	(15)	Summary of macroscopic findings in Fo males after oral administration for 42 days
16	(16-1 ~16-4)	Absolute and relative organ weights of Fo males after oral administration for 42 days
17	(17)	Summary of histopathological findings in Fo males after oral administration for 42 days
18	(18)	Summary of macroscopic findings in Fo females
19-1	(19-1 ~19-4)	Absolute and relative organ weights of Fo females on day 4 of lactation

19-2		Absolute and relative organ weights of Fo females; sacrificed on the way of test period
20	(20)	Summary of histopathological findings in Fo females
21	(21-1 ~21-4)	Reproductive performance of Fo animals
22	(22-1 ~22-4)	Development of F ₁ pups up to day 4 of lactation
23	(23-1 ~23-4)	Body weight of F ₁ pups up to day 4 of lactation
24		Morphological findings of F ₁ pups on day 4 of lactation

Table 1 THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Body weight of Fo males (g); mean \pm S.D. (N)

Compound				
Dose group (mg/kg)	() ±)	100	300	1000
Days of treatment				
1 (Initial weight)	313.8 ± 8.1 (13)	314.3 ± 9.2 (13)	314.1 ± 7.8 (13)	314.1 ± 8.3 (13)
8	365.3 ± 14.4 (13)	359.7 ± 12.5 (13)	364.7 ± 19.4 (13)	363.1 ± 15.2 (13)
15	407.7 ± 19.1 (13)	396.3 ± 17.6 (13)	408.3 ± 28.6 (13)	399.2 ± 21.1 (13)
22	431.5 ± 23.6 (13)	416.3 ± 18.2 (13)	434.8 ± 35.1 (13)	423.9 ± 23.9 (13)
29	459.0 ± 30.8 (13)	444.0 ± 20.8 (13)	465.0 ± 45.0 (13)	452.8 ± 30.6 (13)
36	488.6 ± 37.6 (13)	469.2 ± 25.8 (13)	489.5 ± 52.3 (13)	478.0 ± 36.1 (13)
42	503.1 ± 39.7 (13)	484.2 ± 27.7 (13)	500.6 ± 53.5 (13)	488.2 ± 40.0 (13)

^{*):} vehicle control, DW (5 ml/kg)

Table 2 THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Body weight gain of Fo males (g); mean \pm S.D. (N)

Compound	THA							
Dose group (mg/kg)	0*,		100		300	1000		
Days of treatment				,				
1 ~ 8	51.5 ± 8.7	(13)	45.4 ± 9.8	(13)	50.6 ± 13.8 (13)	49.0 ± 8.7 (13)		
8 ~ 15	42.4 ± 8.1	(13)	36.7 ± 6.6	(13)	43.7 ± 10.0 (13)	36.1 ± 9.5 (13)		
15 ~ 22	23.8 ± 6.1	(13)	20.0 ± 3.7	(13)	26.4 ± 8.8 (13)	24.7 ± 8.9 (13)		
22 ~ 29	27.5 ± 8.8	(13)	27.7 ± 7.5	(13)	30.2 ± 11.5 (13)	28.9 ± 7.5 (13)		
29 ~ 36	29.6 ± 8.5	(13)	25.3 ± 7.3	(13)	24.4 ± 9.2 (13)	25.2 ± 7.9 (13)		
36 ~ 42	14.5 ± 7.2	(-13)	15.0 ± 5.4	(13)	11.2 ± 12.3 (13)	10.2 ± 10.2 (13)		
1 ~ 15	93.9 ± 14.1	(13)	82.0 ± 15.0	(13)	94.2 ± 22.8 (13)	85.1 ± 15.5 (13)		
1 ~ 22	117.7 ± 19.1	(13)	102.0 ± 16.0	(13)	120.7 ± 29.8 (13)	109.8 ± 18.1 (13)		
1 ~ 29	145.2 ± 26.4	(13)	129.6 ± 20.0	(13)	150.9 ± 40.2 (13)	138.7 ± 24.9 (13)		
1 ~ 36	174.8 ± 33.0	(13)	154.9 ± 25.1	(13)	175.3 ± 47.1 (13)	163.9 ± 30.7 (13)		
1 ~ 42	189.3 ± 35.6	(13)	169.9 ± 27.0	(13)	186.5 ± 48.1 (13)	174.1 ± 34.7 (13)		

[&]quot;: vehicle control, DW (5 ml/kg)

Table 3

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of Fo females during pre-mating period (g); mean \pm S.D. (N)

Compound	THA						
Dose group (mg/kg)	0*;	100	300	1000			
Days of treatment							
1 (Initial weight)	210.3 ± 6.9 (13)	210.8 ± 6.7 (13)	210.9 ± 6.3 (13)	211.1 ± 7.0 (13)			
8	226.9 ± 7.0 (13)	225.4 ± 9.6 (13)	231.4 ± 9.2 (13)	228.4 ± 10.6 (13)			
15	236.8 ± 7.7 (13)	234.8 ± 12.2 (13)	247.3 ± 12.7 (13)	242.3 ± 13.6 (13)			

^{*):} vehicle control, DW (5 ml/kg)

`

•

.. -. -.-

-

Table THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Body weight gain of Fo females during pre-mating period (g); mean \pm S.D. (N)

Compound	ТНА							
Dose group (mg/kg)	0*1		100	300	1000			
Days of treatment								
1 ~ 8	16.6 ±	5.5 (13)	14.6 ± 6.1 (13)	20.4 ± 6.9 (13)	17.3 ± 6.1 (13)			
8 ~15	9.9 ±	4.4 (13)	9.4 ± 5.4 (13)	15.9 ± 5.3* (13)	13.9 ± 6.3 (13)			
1 ~15	26.5 ±	7.7 (13)	24.0 ± 9.7 (13)	36.4 ± 11.3* (13)	31.2 ± 10.4 (13)			

a): vehicle control, DW (5 ml/kg)
 *: significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

Table 5 THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Body weight of Fo females during pregnancy period (g); mean \pm S.D. (N)

Compound		THA			
Dose group (mg/kg)	0*)	100	300	1000	
Days of pregnancy					
0	245.2 ± 10.0 (1	2) 245.1 ± 13.5 (12)	256.6 ± 13:2 (10)	244.6 ± 13.1 (12)	
7	282.5 ± 12.9 (1	2) 283.3 ± 17.9 (12)	296.6 ± 21.0 (10)	: 278.4 ± 14.0 (12)	
14	323.2 ± 20.3 (1	2) 319.2 ± 24.0 (12)	336.3 ± 23.7 (10)	311.5 ± 15.0 (12)	
20	400.1 ± 24.9 (1	2) 390.5 ± 29.6 (12)	403.4 ± 20.4 (10)	375.8 ± 17.9* (12)	

^{*):} vehicle control, DW (5 ml/kg)
* : significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

Table THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Body weight gain of Fo females during pregnancy period (g); mean \pm S.D. (N)

Compound	THA						
Dose group (mg/kg)	0.43		100		300	1000	
Days of pregnancy		-		-			
0 ~ 7	37.3 ± 7.9	(12) 38	3.1 ± 7.9	(12)	40.1 ± 9.7 (10)	33.8 ± 6.2 (12)	
7 ~ 14	40.8 ± 8.5	(12) 3!	5.9 ± 7.4	(12)	39.7 ± 5.3 (10)	33.2 ± 6.2* (12)	
14 ~ 20	76.9 ± 9.8	(12) 7:	1.3 ± 13.0	(12)	67.1 ± 10.2 (10)	64.3 ± 12.1 (12)	
0 ~ 14	78.0 ± 15.6	(12) 7	4.1 ± 13.9	(12)	79.8 ± 12.3 (10)	66.9 ± 8.7 (12)	
0 ~ 20	154.9 ± 19.0	(12) 14	5.4 ± 18.9	(12)	146.8 ± 11.4 (10)	131.2 ± 13.9** (12)	

^{*&#}x27;: vehicle control, DW (5 ml/kg)

*: significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

**: significant difference from control, p<0.01 (by multiple comparisons)

supmental toxicity screening test in rats

...maies during lactation period (g): mean ± S.D. (N)

Compound	THA				
Dose group (mg/kg)	0*)	100	300	1000	
Days of lactation					
0	282.1 ± 17.1 (12)	287.7 ± 23.6 (12)	309.3 ± 32.3 (10)	281.8 ± 29.0 (12)	
4	299.5 ± 14.0 (12)	300.9 ± 17.8 (12)	324.2 ± 25.8* (10)	303.4 ± 24.9 (12)	

^{**):} vehicle control, DW (5 ml/kg)
*: significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

Table 8

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of Fo females during lactation period (g): mean \pm S.D. (N)

Compound	THA				
Dose group (mg/kg)	O a 1	100	300	1000	
Days of lactation 0 ~ 4	17.4 ± 18.4 (12)	13.2 ± 15.7 (12)	15.0 ± 13.7 (10)	21.6 ± 11.4 (12)	

a): vehicle control, DW (5 ml/kg)

Table 9 THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Food consumption of Fo males (g); mean \pm S.D. (N)

Compound	ТНА					
Dose group (mg/kg)	0=)	100	300	1000		
Days of treatment						
1 ~ 8	209.4 ± 17.7 (13)	202.4 ± 12.0 (13)	210.5 ± 23.0 (13)	206.7 ± 18.8 (13)		
8 ~ 15	215.0 ± 19.5 (13)	201.7 ± 15.2 (13)	214.7 ± 23.5 (13)	205.6 ± 18.1 (13)		
29 ~ 36	212.1 ± 24.9 (13)	201.2 ± 17.6 (13)	211.7 ± 29.7 (13)	206.3 ± 24.4 (13)		
36 ~ 42	179.4 ± 18.9 (13)	171.0 ± 14.9 (13)	.176.4 ± 22.6 (13)	172.8 ± 23.0 (13)		

^{*):} vehicle control, DW (5 ml/kg)

Table 10

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of Fo females during pre-mating period (g); mean \pm S.D. (N)

Compound		THA	THA										
Dose group (mg/kg)	0*)	100	300	1000									
Days of treatment													
1 ~ 8	134.3 ± 13.1 (13)	132.2 ± 9.3 (13)	138.1 ± 12.2 (13)	137.0 ± 10.5 (13)									
8 ~ 15	133.3 ± 10.5 (13)	133.1 ± 11.4 (13)	142.7 ± 14.5 (13)	134.6 ± 12.4 (13)									

^{*):} vehicle control, DW (5 ml/kg)

Table II

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of Fo females during pregnancy period (g); mean \pm S.D. (N)

Compound		THA		
Dose group (mg/kg)	0=)	100	300	1000
Days of pregnancy				
0 ~ 7	169.7 ± 18.9 (12)	173.6 ± 16.6 (12)	181.4 ± 23.6 (10)	161.3 ± 14.3 (12)
7 ~ 14	186.5 ± 25.6 (12	184.6 ± 23.2 (12)	193.6 ± 24.7 (10)	172.0 ± 16.3 (12)
14 ~ 20	141.8 ± 14.2 (12	138.6 ± 11.5 (12)	143.3 ± 10.8 (10)	134.1 ± 13.6 (12)

^{*):} vehicle control, DW (5 ml/kg)

Table 12

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F_0 females during lactation period (g); mean \pm S.D. (N)

Compound		THA											
Dose group (mg/kg)	(a)	100	300	1000									
Days of lactation	107.2 ± 20.2 (12)	113.5 ± 33.0 (12)	115.5 ± 11.6 (10)	121.1 ± 35.8 (12)									

^{*):} vehicle control, DW (5 mi/kg)

Table 13 THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Hematological findings of F_0 males after oral administration for 42 days

THA (mg/kg)	R·B C (x10 ⁴ /mm ³)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	MCV (μm³)	MCH (pg)	MCHC (%)	Platelet (x104/mm³)
0 a)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	808	15.5	45.5	56. 4	19.3	34.2	100. 1
	± 39	± 0.4	± 1.1	± 1. 7	± 0.7	± 0.4	± 7. 0
100	(13) 794 ± 36	(13) 15.2 ± 0.8	(13) 44.6 ± 1.9	(13) 56.2 ± 1.6	(13) 19.1 ± 0.7	(13) 34.0 ± 0.4	(13) 101. 1 ± 8. 6
300	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	806	15.4	45.8	56.9	19.1	33.6**	101.9
	± 36	± 0.4	± 1.3	± 2.2	± 0.8	± 0.3	±10.9
1000	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	825	15. 8	47.0*	56.9	19.2	33. 7*	104.9
	± 34	± 0. 4	± 1.6	± 1.6	± 0.7	± 0. 6	± 8.6

THA (mg/kg)	WBC (x100/mm³)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0 =)	(13) 88 ± 25	(13) 0 ± 0	(13) 17 ±12	(13) ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 2 ± 2	(13) 79 ±13
100	(13) 73 ± 18	(13) ± 0	(13) 18 ± 6	(13) 0 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 3 ± 2	(13) 78 ± 6
300	(13) 72 ± 23	(13) 0 ± 0	(13) 30** ±15	(13) ± 2	(13) 0 ± 0	(13) 5 ± 3	(13) 64** ±13
1000	(13) 92 ± 21	(13) 0 ± 0	(13) 23 ± 7	(13) ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 4 ± 3	(13) 72* ± 8

* : Significantly different from vehicle control, p<0.05 ** : Significantly different from vehicle control, p<0.01

Parameter: mean ± S.D.
(): number of animals
a): vehicle control, DW(5ml/kg)

Table 14
THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats
Biochemical findings of R. males after oral administration for 42 days

Biochemical	findings of l	to males after	er oral admin	istration fo	or 42 days				
THA (mg/kg)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Total bilirubin (mg/dl)	Tri- glyceride (mg/dl)
0 *)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5. 4	2.9	1.11	19	0.8	149	50	0. 08	67
	± 0. 3	± 0.2	± 0.09	± 4	± 0.1	±18	±10	± 0. 03	±28
100	(13) 5.3 ± 0.2	(13) 2.9 ± 0.2	(13) 1.22* ± 0.09	(13) ± 2	(13) 0.7* ± 0.1	(13) 133 ±12	(13) 43 ± 9	(13) 0.09 ± 0.03	(13) 49 ±16
300	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5. 4	2.9	1.13	19	0.7	132	45	0.09	50
	± 0. 3	± 0.2	± 0.10	± 2	± 0.1	± 8	± 9	± 0.02	±15
1000	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5. 7*	3.0	1.10	20	0.7*	113**	50	0.09	46
	± 0. 2	± 0.1	± 0.11	± 2	± 0.1	± 9	± 9	± 0.02	±13
THA	Na	K	C1	Ca	Inorg. phos. (mg/dl)	ALP	GPT	GOT	γ-GTP
(mg/kg)	(mEq/1)	(mEq/1)	(mEq/1)	(mg/d1)		(U/1)	(U/l)	(U/1)	(U/1)
0 •)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	143. 1	3. 93	105. 9	8.5	5.5	206	27	61	0
	± 0. 4	± 0. 18	± 1.0	± 0.3	± 0.5	±53	± 4	±11	± 0

THA	Na	K	C1	Ca	Inorg. phos. (mg/dl)	ALP	GPT	GOT	γ -GTP
(mg/kg)	(mEq/1)	(mEq/1)	(mEq/1)	(mg/d1)		(U/1)	(U/1)	(U/1)	(U/1)
0 *)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	143. 1	3. 93	105. 9	8.5	5.5	206	27	61	0
	± 0. 4	± 0. 18	± 1. 0	± 0.3	± 0.5	±53	± 4	±11	± 0
100	$\begin{array}{c} (13) \\ 143.7 \\ \pm 0.7 \end{array}$	(13) 4.13 ± 0.30	(13) 107. 4** ± 1. 2	(13) 8.4 ± 0.2	(13) 5.6 ± 0.5	(13) 234 ±41	(13) 26 ± 5	(13) 61 ± 6	(13) 0 ± 0
300	(13) 143.4 ± 1.0	(13) 3.93 ± 0.29	(13) 107. 3* ± 1. 0	(13) 8.4 ± 0.3	(13) 5.4 ± 0.5	(13) 195 ±29	(13) 29 ± 8	(13) 73 ±17	(13) 0* ± 1
1000	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	144.6**	3.61**	107.6**	8.5	5.5	203	34*	82**	0*
	± 1.0	± 0.19	± 1.6 -	± 0.2	± 0.3	±38	± 6	±20	± 1

Parameter: mean ± S.D.
(): number of animals
a): vehicle control, DW(5ml/kg)

* : Significantly different from vehicle control, p<0.05 ** : Significantly different from vehicle control, p<0.01





Table 15 THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Summary of macroscopic findings in Fo males after oral administration for 42 days

Group Grade	Control +			10	00 mg/	/kg +	30	00 mg/	/kg +	1000 mg/kg - +		
Brain)	[13]			[13]			[13]			[13]		
Defect, cerebral cortex,						_			_			
focal		12	1		13	0	_	13	0		13	0
Liver)	[13]			[13]			[13]			[13]		
Accentuated lobular pattern		11	2		13	0		13	0		13	0
Area, pale color		13	0		13	0		12	1		12	1
Focus, liner, black		13	0		13	0		12	1		13	0
Kidney)	[13]			[13]			[13]			[13]		
Area, recessed		13	٥		12	1	()	13	0	(=-,	13	0
Spot, dark color,												
Cortico-medullary junction		12	1		13	0		13	0		13	0
Epididymis)	[13]			[13]			[13]			[13]		
Nodule	_	13	0		12	1		13	0		13	0
Lung)	[13]			[13]			[13]			[13]		_
Spot/area,							••			• •		
dark brown/dark red		12	1		12	1		12	1		12	1
Seminal vesicle)	[13]		_	[13]		~	[13]		~	[13]		_
Small	, 10,	12	T	[10]	13	0	[10]	13	0	(10)	13	0

^{-,} Negative; +, Positive []. Number of animals examined

Table 16 THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Absolute and relative organ weights of Fo males after oral administration for 42 days; mean \pm S.D. (N)

Compound			THA		
Dose group (mg/kg)		0.,	100	300	1000
Terminal body weight	(g)	474.9 ± 39.4 (13)	454.8 ± 26.9 (13)	473.6 ± 49.5 (13)	459.1 ± 36.4 (13)
Liver	(g)	13.56 ± 2.03 ^{b)} (13) 2.84 ± 0.23 ^{c)}	11.63 ± 1.02* (13) 2.56 ± 0.17***	12.82 ± 1.95 (13) 2.70 ± 0.17	12.55 ± 1.39 (13) 2.73 ± 0.13
Kidneys	(g)	2.93 ± 0.24 (13) 0.62 ± 0.04	2.82 ± 0.19 (13) 0.62 ± 0.04	2.99 ± 0.27 (13) 0.63 ± 0.05	2.84 ± 0.27 (13) 0.62 ± 0.04
Thymus	(mg)	354.0 ± 78.8 (13) 75.3 ± 18.9	314.6 ± 62.3 (13) 69.0 ± 11.7	344.5 ± 61.0 (13) 73.1 ± 12.1	342.0 ±100.7 (13) 73.7 ± 17.7
Testes	(g)	3.17 ± 0.23 (13) 0.67 ± 0.07	3.13 ± 0.21 (13) 0.69 ± 0.07	3.20 ± 0.25 (13) 0.68 ± 0.08	3.08 ± 0.18 (13) 0.67 ± 0.06
Epididymides	(g)	1.14 ± 0.13 (13) 0.24 ± 0.03	1.13 ± 0.10 (13) 0.25 ± 0.03	1.13 ± 0.11 (13) 0.24 ± 0.02	1.13 ± 0.08 (13) 0.25 ± 0.02

^{*):} vehicle control, DW (5 ml/kg)

b): absolute weight
c): relative weight (g or mg per 100g body weight)
*: significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)
**: significant difference from control, p<0.01 (by multiple comparisons)

Table 17

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of histopathological findings in Fo males after oral administration for 42 days

Group Grade		ontr ±	01 +	++	+++	Pos.		100	0 mg/kg ± + ++ +++ Pos.	300 mg/kg - ± + ++ +++ Pos.	10	00 <u>+</u>	mg/ +	kg 	+++	Pos.
(Brain)	[13]						[0]	[0]	[13]					_
Congenital defect,																
cerebral cortex, unilateral	12	0	1	0	0	ì					13	٥	0	0	0	٥
(Liver)	[13]						ſ	0]	[0]	[13]					
Degeneration, fatty,																
hepatocyte, periportal	0-	2	11	0	0	13					0	4	9	0	0	13
Microgranuloma	0	11	2	0	0	13					1	11	1	0	0	12
Necrosis, focal	12	0	1	0	0	1					12	0	1	0	0	1
Hemorrhage, focal	12	1	0	0	0	ı					12	0	1	0	0	1
Fibrosis, capsule, focal	13	0	0	0	0	0					12	1	0	0	Ó	1
(Kidney)	[13]						ſ	01	Ī	0]	[13]					
Eosinophilic body	- 6	3	3	1	0	7	-	-	•	· · •	7	4	2	0	٥	6
Basophilic tubule	6	6	1	Ö	ā	7					9	4	ō	ā	ō	4
Cast, hyalin,	_	-		_	•						=	_	-	_	_	•
Cortico-medullary junction	12	0	1	0	0	1					13	0	0	0	0	0
Dilatation, pelvis	12	ō	ī	õ	ŏ	ĩ					13	õ	ō	ō	ñ	ã
(Spleen)	[13]	•	_	•	•	-	1	01	ſ	01	[13]	_	·	•	•	•
Hematopoiesis, extramedullary	(0	12	1	Ω	0	13	•	٠,	L	. • 1		12	1	0	0	13
Deposit, pigment, brown	ō		8	ŏ	ŏ	13					ŏ	7	6	ŏ	ŏ	13
(Heart)	[13]	·	~	•	•		f	0]	1	[0]	[13]	•	•	•	•	~~
Myocardial degeneration,	[10]						·	U J	,	. 0,	[10]					
focal	12	I	Q	0	0	1					13	0	0	0	Q	0
Myocardial fibrosis, focal	13		õ	ã	0	ō					12	1	Ö	ŏ	Ö	1
(Testis)	[13]	v	·	U	U	U	r	0]	ſ	01	[13]		U	U	U	
Atrophy, seminiferous tubule,	(LO)						Į.	U j	į.	. 01	(LO)					
focal	13	0	0	Ω	0	0					12	1	0	O	0	1
(Epididymis)	[13]	U	U	U	U	U	r	01	r	. 01		_	U	v	U	*
Cell debris, tubular lumen	13	0	0	n	0	0	ī	O J	ţ	[0]	[13] 12	1	0	0	O	1
(Thymus)	[13]	U	U	U	U	U	٢	0]	,	[0]	[13]		U	U	U	1,
	13	0	0	О	0	0	į	O J	Į.	. 01	13	0	O	0	Ω	٥
Abnormality		u	U	U	U	U	r	0.1	,	. 01		U	v	U	U	υ
(Adrenal gland)	[13]		0	0	٥	n	f	0]	Į.	[0]	[13]	^	O	0	0	0
Abnormality	13	0	U	0	U	0	,	٥,١			13	0	U	U	U	U
(Urinary bladder)	[13]			^	^	^	Ł	0]	Į	[0]	[13]	_	_	^	_	_
Abnormality	13	0	0	0	0	0					13	0	0	0	0	0

^{-,} Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe: Pos., Total number of animals with positive grade []. Number of animals examined

Table 18 THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Group Grade	Contro	100_mg,	/kg +	300_mg/	/kg +	1000 mg/kg - +		
Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Dilatation, pelvis	12	1	13	0	13	0	13	0
Area, recessed	13	0	13	0	12	1	13	0
Thymus)	[13]	-	[13]		[13]		[13]	
Red	13	0	12	1	12	1	13	0
Small	10	3	12	1	12	1	12	1
Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Dark red color	13	0	12	1	13	0	13	0
Small	13	0	12	1	13	0	13	0
Glandular stomach)	[13]	-	[13]		[13]	-	[13]	_
Spot, white	12	1	13	0	13	0	13	0
Spot, dark color	13	ō	12	1	13	Ō	13	Ō

Summary of macroscopic findings in Fo females

^{-.} Negative; †. Positive
[]. Number of animals examined

Table 19 - 1 THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Absolute and relative organ weights of Fo females on day 4 of lactation; mean \pm S.D. (N)

Compound			ТНА		
Dose group (mg/kg)		0*)	100	300	1000
Terminal body weight	(g)	299.5 ± 14.0 (12)	300.9 ± 17.8 (12)	324.2 ± 25.8* (10)	303.4 ± 24.9 (12)
Liver	(g)	12.92 ± 1.29 ^b) (12) 4.31 ± 0.38 ^c)	12.28 ± 1.25 (12) 4.08 ± 0.33	13.40 ± 1.37 (10) 4.14 ± 0.32	12.60 ± 1.55 (12) 4.16 ± 0.42
Kidneys	(g)	1.97 ± 0.24 (12) 0.66 ± 0.08	1.87 ± 0.21 (12) 0.62 ± 0.07	2.06 ± 0.22 (10) 0.63 ± 0.04	1.89 ± 0.13 (12) 0.63 ± 0.06
Thymus .	(mg)	150.0 ± 61.7 (12) 50.4 ± 21.7	165.1 ± 47.7 (12) 54.6 ± 14.6	213.2 ± 62.5 (10) 65.1 ± 15.6	184.3 ± 62.5 (12) 60.1 ± 18.2

a): vehicle control, DW (5 ml/kg)
b): absolute weight
c): relative weight (g or mg per 100g body weight)
*: significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

Table 19 - 2

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weights of Fo females; sacrificed on the way of test period (non-pregnant)

Animal	Terminal	Li	ver	Ki	dneys	Thymus		
no.	body weight (g)	Absolute (g)	Relative	Absolute (g)	Relative	Absolute (mg)	Relative	
FB01009	263.3	8, 29	3. 15	1.86	0.71	232.0	88. 1	
FB02010	308. 2	9. 41	3.05	1.95	0.63	433.9	140.8	
FB03002 FB03008 FB03010	286. 6 272. 9 290. 0	9.56 8.73 9.48	3.34 3.20 3.27	1.73 1.79 1.96	0.60 0.66 0.68	229.9 313.3 364.6	80. 2 114. 8 125. 7	
FB04006	287. 0	10.17	3.54	1.97	0.69	278.9	97. 2	

Relative: g or mg per 100g body weight

Table 20

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of histopathological findings in Fo females

Group Grade		ontr ±	ol †	++	+++	Pos.		10) mg/kg ± + ++ +++ Pos.		300 mg/kg - ± + ++ +++ Pos.	10	000 ±	mg/ +	kg 	+++	Pos.
(Liver)	[13]	-				=	(0]		Į.	0]	[13]					
Degeneration, fatty,		_	_	_	_	•						_	_	_		_	
hepatocyte, periportal	4	. 7	2	ū	0	9						3	- 8	2	0	0	10
Microgranuloma	3	10	0	0	0	10							12	0	0	0	12
(Kidney)	[13]		_	_			L	0]		ŧ	0]	[13]					
Basophilic tubule	. 9	4	0	0	0	4	_			_		7	6	0	0	0	6
(Spleen)	[13]						[0]		[0]	[13]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	3	8	2	0	13						0	5	6	2	0	13
Deposit, pigment, brown	0	1	7	5	0	13						0	3	9	1	0	13
(Thymus)	[13]						1	0]		Į	0]	[13]					
Atrophy	6	5	1	1	0	7						9	4	0	0	0	4
(Brain)	[13]						[0]		[0]	[13]					
Abnormality	13	0	0	0	0	0						13	0	0	0	0	0
(Heart)	[13]						ſ	0]		ſ	0]	[13]					
Abnormality	13	0	0	0	0	0	•	•		-	•	13	0	0	0	0	0
(Adrenal gland)	[13]						ſ	0]		ſ	0]	[13]					
Abnormality	13	0	0	0	0	0	•	•		•	•	13	0	0	0	0	0
(Urinary bladder)	[13]	_	•	_	-	-	ſ	0]		f	0]	[13]	_	•		-	•
Abnormality	13	0	0	0	0	٠0	•			٠	- •	13	0	0	0	Ω	0
(Ovary)	[1]	_	•	_	_	•	{	1]		ſ	31	[1]	-	•	-	-	_
Abnormality	í	0	0	0	0	O		- 3	0 0 0 0 0		3 0 0 0 0 0	1	0	٥	0	0	0

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

Table 21

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Reproductive performance of Fo animals

Compound	THA								
Dose group (mg/kg)	0*)	100	300	1000					
Number of mated pairs	13	13	13	13					
Number of copulated pairs	13	13	13	13					
Copulation index	100	100	100	100					
Number of pregnant animals	12	12	10	12					
Fertility index	92.3	92.3	76.9	92, 3					
Pairing days until copulation Mean ± S.D. (N)	2.6 ± 0.9(13)	2.8 ± 2.0(13)	2.5 ± 1.1(13)	2.1 ± 0.6(13)					
Frequency of vaginal estrus Mean \pm S.D. (N)	1.0 ± 0.0(13)	1.1 ± 0.3(13)	1.0 ± 0.0(13)	1.0 ± 0.0(13)					

a): vehicle control, DW (5 ml/kg)
Copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs) × 100, %
Fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs) × 100, %

Table 22

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Development of F_1 pups up to day 4 of lactation; mean \pm S.D. (N)

Compound	THA										
Dose group (mg/kg)	0 a)	100	300	1000							
Number of pregnant females	12	12	10	12							
Number of pregnant females with pups alive	12	12	10	12							
Gestation index	100	100	100	100							
Gestation length in days	22.3 ± 0.5 (12) 22.4 ± 0.5 (12)	22.4 ± 0.5 (10)	22.6 ± 0.5 (12)							
Number of corpora lutea	17.5 ± 1.7 (12) 18.2 ± 2.4 (12)	16.0 ± 1.2 (10)	16.3 ± 1.2 (12)							
Number of implantation sites	16.5 ± 1.6 (12) 16.0 ± 3.6 (12)	14.5 ± 2.6 (10)	15.0 ± 2.3 (12)							
Implantation index	94.5 ± 6.0 (12) 87.9 ± 17.0 (12)	90.5 ± 14.9 (10)	91.5 ± 10.0 (12)							
Day 0 of lactation Number of pups born Delivery index Number of live pups Birth index Live birth index	15.2 ± 1.9 (12 91.9 ± 6.6 (12 15.0 ± 2.0 (12 90.9 ± 7.3 (12 98.8 ± 2.7 (12) 89.9 ± 12.2 (12.) 14.2 ± 3.6 (12.) 88.9 ± 13.2 (12.)	92.1 \pm 6.8 (10) 13.4 \pm 2.8 (10) 92.1 \pm 6.8 (10)	13.1 ± 3.1 (12) 85.8 ± 14.0 (12) 13.1 ± 3.1 (12) 85.8 ± 14.0 (12) 100.0 ± 0.0 (12)							
Sex ratio	42.8 ± 14.1 (12) 44.9 ± 13.2 (12)	48.8 ± 11.2 (10)	39.5 ± 13.0 (11)							
Day 4 of lactation Number of live pups Viability index	14.8 ± 2.1 (12 98.2 ± 3.2 (12			13.1 ± 3.1 (12) 100.0 ± 0.0 (12)							
Sex ratio	43.6 ± 14.3 (12) 45.3 ± 13.1 (12.3	49.2 ± 11.5 (10)	39.5 ± 13.0 (11)							

a): vehicle control, DW (5 ml/kg)
Gestation index = (number of pregnant females with live pups / number of pregnant females) × 100, %
Implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea) × 100, %
Delivery index = (number of pups born / number of implantation sites) × 100, %
Birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantation sites) × 100, %
Live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born) × 100, %
Sex ratio = (number of male live pups on day 0 / number of live pups on day 0) × 100, %
Viability index = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 4) × 100, %
Sex ratio = (number of male live pups on day 4 / number of live pups on day 4) × 100, %

Table 23 THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats Body weight of F_1 pups up to day 4 of lactation; mean \pm S.D. (N)

Compound		THA				
Dose group (mg/kg)	0 a)	100	300	1000		
Day 0 of lactation Number of live pups Wale Female	15.0 ± 2.0 (12) 6.5 ± 2.5 8.5 ± 2.0	14.2 ± 3.6 (12) 6.5 ± 2.8 7.7 ± 2.3	13.4 ± 2.8 (10) 6.6 ± 2.2 6.8 ± 1.9	13.1 ± 3.1 (12) 5.5 ± 1.8 8.1 ± 2.4		
Weight of pup (g) Male Female	6.1 ± 0.4 (12)	6.6 ± 0.8 (12)	6.6 ± 0.8 (10)	6.6 ± 0.6 (11)		
	5.9 ± 0.6 (12)	6.2 ± 0.8 (12)	6.2 ± 0.7 (10)	6.3 ± 0.5 (12)		
Day 4 of lactation Number of live pups Male Female	14.8 ± 2.1 (12)	14.1 ± 3.7 (12)	13.3 ± 2.7 (10)	13.1 ± 3.1 (12)		
	6.5 ± 2.5	6.5 ± 2.8	6.6 ± 2.2	5.5 ± 1.8		
	8.3 ± 2.1	7.6 ± 2.4	6.7 ± 1.9	8.1 ± 2.4		
Weight of pup (g) Male Female	9.3 ± 0.8 (12)	10.4 ± 2.3 (12)	10.9 ± 2.0 (10)	10.5 ± 0.9 * (11)		
	9.1 ± 1.1 (12)	10.1 ± 2.1 (12)	10.6 ± 1.6 (10)	10.3 ± 1.0 (12)		

a): vehicle control, DW (5 ml/kg)
 *: significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

Table 24

THA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Morphological findings in F₁ pups on day 4 of lactation

Compound	THA							
Dose group (mg/kg)	0=)	100	300	1000				
Number of pups examined External observation	177	169	133	157				
Visceral observation	177	169	133	157				
Number of pups showing abnormalities External malformations	0	0	0	0				
Visceral malformations	0	0	0	0				

^{*):} vehicle control, DW (5 ml/kg)