

食薬セ研第11-1745号

2001年 7月26日

オートルエンシルホンアミドの  
ラットを用いる  
経口投与簡易生殖毒性試験

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】

|                      |    |
|----------------------|----|
| 要約 .....             | 1  |
| 緒言 .....             | 2  |
| 方法 .....             | 3  |
| 1. 被験物質 .....        | 3  |
| 2. 使用動物および飼育方法 ..... | 3  |
| 3. 投与検体の調製 .....     | 4  |
| 4. 投与量および投与方法 .....  | 4  |
| 5. 観察および検査 .....     | 5  |
| 6. データ解析法 .....      | 7  |
| 結果 .....             | 9  |
| 1. 親動物 .....         | 9  |
| 2. 生殖能力 .....        | 11 |
| 3. 出生児 .....         | 12 |
| 考察 .....             | 13 |
| 文献 .....             | 14 |

Figs. 1~4

Tables 1~18

## 【要 約】

Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS, SPF] 雌雄ラットの交配前 2 週間および交配期間ならびに雄では交配期間終了後剖検前日まで、雌では妊娠期間を通して哺育 3 日まで、*o*-トルエンスルホンアミド (以下 TSA と略記) の 0、4、20 および 100 mg/kg を経口投与し、雌雄ラットに対する生殖毒性について検討した。

成績は、以下のように要約される。

### 1. 親動物所見

いずれの投与群においても死亡動物はみられなかった。雌雄の 100 mg/kg 投与群において、投与直後に活動性の低下および流涎が観察された。

体重は、100 mg/kg 投与群で増加が抑制されたが、摂餌量には TSA 投与の影響はみられなかった。

剖検所見および病理組織学的検査では、被験物質の投与によると考えられる異常は認められなかった。

### 2. 生殖能力所見

性周期、交尾および受胎能力、妊娠期間、分娩ならびに哺育状態に、TSA の投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

### 3. 出生児所見

出生児の生存性および体重には、TSA 投与の影響は認められなかった。

被験物質の投与によると考えられる形態異常は観察されなかった。

### 4. 無作用量

以上の成績から、本試験条件下における *o*-トルエンスルホンアミドの親動物に対する無作用量は、100 mg/kg 投与群において体重増加抑制、流涎等の症状が認められたことから 20 mg/kg/day、親動物の生殖能力、および、出生児に対する無作用量は、ともに 100 mg/kg までの投与で何ら異常が認められなかったことから、いずれも 100 mg/kg/day と判断された。

## 【緒 言】

o-トルエンスルホンアミド（以下TSA と略記）は、サッカリンの主要な不純物であり、1997年度の既存化学物質安全性点検事業によって、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験が実施されている。この反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験においては、体重増加および摂餌の抑制、一般状態における活動性の低下や流涎、血小板数の増加、アルカリフォスファターゼ活性の低下、総コレステロール、総蛋白濃度の増加、ブドウ糖、トリグリセライド濃度の低下、小葉中心性の肝細胞の肥大、腎臓におけるeosinophilic bodyの増強が認められ、これらの変化を被験物質による甲状腺および脾臓に対する変化によるものと考察している<sup>1)</sup>。また、文献検索の結果から、甲状腺におけるホルモン合成阻害にともなう甲状腺機能低下の可能性が示唆されたとしている。しかし当試験においては予めこうした情報は得られていなかったため病理組織学的検査は一部の動物について行われたに過ぎない。そこで、今回改めて、1999年度の既存化学物質の安全性点検にかかわる毒性調査事業の一環として、TSA の28日反復投与毒性試験および、簡易生殖毒性試験を実施した。文献検索によると、TSA を母動物に経口的に摂取させた場合、胎児に低頻度ながらも水晶体の空胞変性が認められるとする報告がみられることから<sup>2)</sup>、今回の試験においては、高用量群における出生児の眼球の病理組織学検査を追加した。

本簡易生殖毒性試験では、ラットを用いて TSA 経口投与時の、本化合物の雌雄動物の生殖能力に及ぼす影響について検討したので、その結果を報告する。

## 【方 法】

### 1. 被験物質

o-トルエンスルホンアミド（以下 TSA と略記）は、英名は o-Toluenesulfonamide であり、CAS No. 88-19-7、分子量：171.22、分子式：C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S、融点 156.7℃ の白色結晶性粉末である。

本試験には、より提供された TSA（ロット番号： 、純度：99.95wt%）を用いた。受領した被験物質は使用時まで被験物質受領保管室において、室温で保管した。なお、試験期間中の被験物質の安定性は提供者が提供前および返却後（試験終了後）の被験物質について品質試験を実施することにより確認した（Appendix A）。

### 2. 使用動物および飼育方法

7 週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS、SPF] 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後14日間予備飼育した。予備飼育中、動物の一般状態の異常は認められなかった。なお、雌は予備飼育中に毎日膣スメアを採取し、観察期間中に2回以上性周期が回帰している動物を選出した。使用した動物はすべて、性周期が4日周期を示した。動物は、雌雄とも検疫終了日の体重を基に体重別層化無作為抽出法により群分けし、雌雄とも1群13匹からなる4群に分けた。群分け後、すべての雌雄は、耳パンチにより個体識別をおこなった。各飼育ケージには、投与群ごとに色彩の異なるカードに試験計画番号および個体識別番号を記入して掛け個体識別の補助とした。出生児の個体識別は行わなかった。投与開始時の週齢は、雌雄ともに9週齢であった（注）。

---

（注） 動物入荷日：2000年3月8日

入荷匹数：雄57匹、雌73匹

入荷時体重：雄 198.9～218.5g、雌 161.0～179.1g

投与開始日：2000年3月22日

投与開始時体重：雄 317.6～366.3g、雌 211.0～240.3g

---

動物は、照明12時間（7時～19時点灯）、換気回数約15回/時、温度23.5～25.0℃、湿度51～65%に制御された飼育室で、金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に1匹ずつ（交配時は2匹/ケージ）収容し、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。ただし、交尾が確認された雌については、妊娠14日から哺育4日まで、紙パルプ製チップ（ALPHA-dri 加商株式会社）を入れたプラスチック製ラット用繁殖ケージ（350w×400d×180h mm）に収容した。また、供給した飼料、水道水および紙パルプ製チップには、試験に支障をきたす可能性のある混入物はなかった。

### 3. 投与検体の調製

媒体は0.5 %CMC Na 水溶液〔カルボキシメチルセルロースナトリウム（日本薬局方カルメロースナトリウム、ロット番号：6Z09、丸石製薬株式会社）および注射用水（ロット番号：9707SA、光製薬株式会社）を用いて調製〕を選択した。投与検体は、TSA を各濃度ごとに秤量し、媒体に懸濁して調製した。調製した検体は、冷蔵、気密の条件下で保存し、調製後1週間以内に使用した。

投与検体の安定性については、先に秦野研究所で実施した試験（試験計画番号：A-97-029）において、被験物質の0.1 および 20 % (w/v) の調製検体の、冷蔵、気密条件下での8日間の安定性が確認されている（Appendix B）。0.08% (w/v) の調製検体については、2000年2月28日から8日間の安定性試験を実施した結果、安定であることが確認された（Appendix C）。

初回調製した各濃度の検体について、被験物質の含量測定および均一性試験を実施した結果、攪拌後の投与検体には所定濃度の TSA が均一に含有されていることが確認された（Appendix D, E）。なお、調製検体中の被験物質の濃度の測定は、高速液体クロマトグラフにより測定した（Appendix F）。

### 4. 投与量および投与方法

投与経路は、OECD化学物質試験法ガイドラインによりラット用胃管による強制経口投与とした。投与量は、先に実施された $\alpha$ -トルエンスルホンアミドの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（試験計画番号：R-97-011）の結果をもとに設定した。すなわち、雌雄ラットに TSA の 0、20、100 および 500 mg/kg を交配前2週間、交配期間、さらに

雄では交配後2週間、雌では哺育3日まで経口投与した結果、100 mg/kg 以上の投与群において投与開始後から自発運動の低下が認められ、投与期間中期からは流涎が認められ、投与の初期には体重増加および摂餌量の抑制が認められたことから、高用量には 100 mg/kg を設定し、公比 5 で減じて中用量には 20 mg/kg を、低用量には 4 mg/kg を設定した。対照群には、TSA の媒体である 0.5% CMC Na 水溶液を用いた。

投与期間は、雄に対しては交配前2週間、交配期間（最長2週間）、剖検前日まで（総投与回数47回）、雌に対しては交配前2週間、交配期間（最長2週間）、交尾した雌では、妊娠期間を通して哺育3日（分娩日＝哺育0日）まで（投与回数41～44回）、交尾後、分娩の認められなかった雌は妊娠26日相当日まで（投与回数41～44日）、交尾しなかった雌は剖検前日まで（総投与回数54回）とし、1日1回、9時から12時の間に投与した。投与容量は体重 1 kg 当たり 5 mL とし、雄および交配前、交配期間中の雌では、週1回測定した体重を基に、交尾確認後の雌では、最新の測定日の体重を基に算出した。

各群の投与量、投与容量、調製濃度および動物番号は次の通りである。

| 群 | 被験物質            | 投与量<br>(mg/kg) | 投与容量<br>(mL/kg) | 濃度<br>(w/v%) | 動物番号       |            |
|---|-----------------|----------------|-----------------|--------------|------------|------------|
|   |                 |                |                 |              | 雄          | 雌          |
| 1 | 0.5% CMC Na 水溶液 | 0              | 5               | 0            | MX01001～13 | FB01001～13 |
| 2 | TSA             | 4              | 5               | 0.080        | MX02001～13 | FB02001～13 |
| 3 | TSA             | 20             | 5               | 0.40         | MX03001～13 | FB03001～13 |
| 4 | TSA             | 100            | 5               | 2.0          | MX04001～13 | FB04001～13 |

## 5. 観察および検査

### 1) 親動物

#### (1) 一般状態

飼育期間中、毎日1回以上観察した。

#### (2) 体重測定

投与期間中週1回ならびに解剖日に測定した。交尾が確認された雌では妊娠0、7、14、20日に、分娩した雌では哺育0および4日に測定した。

### (3) 摂餌量測定

投与期間中（交配期間を除く）週1回、体重測定日と同じ日に給餌量を測定し、その翌日に残餌量を測定し、1日の摂餌量を算出した。交尾が確認された雌では妊娠0、7、14、20日および分娩した雌では、哺育1、3日の翌日までの摂餌量を測定した。

### (4) 性周期

予備飼育中に引き続いて投与開始日以降も、毎日、膣スメアを採取して、性周期を観察した。なお、膣スメア採取は、交尾した雌では交尾成立日まで、交尾しなかった雌では交配期間の終了まで継続して行った。

### (5) 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の連続同居方式で行った。交尾の確認は、膣スメア中の精子の存在あるいは膣栓の確認により行い、交尾が確認された雌については、その日を妊娠0日として起算するとともに、雄から分離して個別に飼育した。交配結果および妊娠の成否により、各投与群における交尾率〔(交尾確認動物数/交配動物数)×100〕、受胎率〔(妊娠動物数/交尾確認動物数)×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。

### (6) 分娩・哺育状態の観察

交尾が確認された雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の直接観察は観察可能な動物について行い、分娩状態が直接観察できなかった動物についても、分娩後の徴候から分娩障害の有無を判断して記録した。分娩の確認は、午前9時～11時に行い、分娩が完了していることを確認した動物については、その日を分娩日（哺育0日）として妊娠期間（妊娠0日～分娩日の日数）を算出した。分娩後は哺育状態を毎日観察した。

### (7) 剖検・病理組織学検査

雄動物は、投与47日の翌日に、致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、剖検した。その際、下垂体、甲状腺、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、下垂体、甲状腺は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に、精巣および精巣上体はブアン液に固定し、高用量群および対照群の全例について病理組織学検査を実施した。



雌動物のうち、分娩した雌は哺育4日に、交尾は確認されたが分娩しなかった雌は妊娠26日相当日に、交尾しなかった雌は投与54日の翌日にそれぞれ致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、剖検した。その際、下垂体、甲状腺、卵巣および子宮を摘出して、卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮については着床数を数え、着床率〔(着床数/妊娠黄体数)×100〕を算出した。また、下垂体、甲状腺、卵巣は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定し、高用量群および対照群の全例について、病理組織学検査を実施した。また、雌雄とも、剖検時に異常を認めた器官についても病理組織学検査を実施した。

## 2) 出生児

### (1) 産児数および死亡児

哺育0日に産児数(生存児+死亡児)を調べて、分娩率〔(産児数/着床痕数)×100〕および生児出産率〔(出產生児数/着床痕数)×100〕を求めた。また、出産率〔(生児出産雌数/妊娠動物数)×100〕を算出した。生存児は外表を観察し、性別および外表奇形(矮小児を含む)の有無を検査した。

哺育0日以降は死亡児数を毎日調べ、出生率〔(出產生児数/総産児数)×100〕および新生児生存率〔(哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100〕を求めた。観察可能な死亡児は剖検した。

哺育4日の児は、眼球の病理検査を、対照群は1母動物あたり雌雄各1例、高用量群では1母動物あたり雌雄各4例について実施した。なお、動物番号FB04009およびFB04010の雄の児、動物番号FB04012の雌の児は出生児数が4匹に満たなかったため、観察可能な出生児についてのみ検査を行った。

### (2) 体重

哺育0および4日に個体別に測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出した。

### (3) 剖検

出生児は哺育4日に剖検し、外表および内部器官の異常の有無を観察した。

## 6. データ解析法

交尾率、受胎率および出生児の形態異常出現頻度については Fisher の直接確率検定を行った。病理組織学所見では、グレード分けしたデータは、Mann-WhitneyのU検定により、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により対照群と TSA 投与

群の間の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各腹ごとの平均値を1標本として、先ず Bartlett 法により各群の分散の一樣性について検定を行った。分散が一樣である場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett 法により多重比較を行った。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樣でない場合には、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った。有意水準は、5%とした。

## 【結 果】

### 1. 親動物

#### 1) 一般状態 (Tables 1, 2; Appendices 1-1~2-4)

雌雄ともに死亡動物はみられなかった。

投与後に活動性の低下と流涎が観察された。活動性の低下は、100 mg/kg 投与群の雌雄全例に、投与3日から観察された。流涎は、100 mg/kg 投与群の雄12例、雌11例に投与4日から観察された。活動性の低下と流涎は投与後4時間以内に回復した。その他の一般状態の変化として、脱毛が4 mg/kg 投与群の雌2例（動物番号:FB02011、FB02012）、および、100 mg/kg 投与群の雄1例（動物番号:MX04013）に、紅涙が4および100 mg/kg 投与群の雄で各1例（動物番号:MX02005、MX04011）、赤色尿が20 mg/kg 投与群の雄1例（動物番号:MX03010）に認められた。

#### 2) 体重 (Fig. 1, 2; Tables 3~6; Appendices 3-1~6-4)

体重推移は、100 mg/kg 投与群が対照群に対して低値で推移した。

雄では投与1~8、1~15、1~22および43~48日の体重増加量が、雌では投与15日の実測値および投与1~15日の体重増加量が対照群と比較して有意( $p<0.05$ 、 $p<0.01$ )な低値を示したが、雌雄ともに20 mg/kg 以下のTSA各投与群においては、対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 3) 摂餌量 (Fig. 3, 4; Tables 7~8; Appendices 7-1~8-4)

雄の摂餌量にはTSA投与の影響はみられなかった。雌では20 mg/kg 投与群の妊娠20~21日の摂餌量が有意( $p<0.05$ )な低値を示したが、分娩前の雌では摂餌量の減少はよくみられる変化であること、100 mg/kg 投与群では有意差は認められないことから、TSAの投与とは関係の無い変化であると考えられた。

#### 4) 剖検所見 (Tables 9, 10; Appendices 9-1~10-4)

雄では、精巣の小型化が対照群の1例（動物番号:MX01010）、4 mg/kg 投与群の2例（動物番号:MX02005、MX02007）に観察された。また、一般状態の変化として赤色尿が観察された20 mg/kg 投与群の雄1例（動物番号:MX03010）に腎盂拡張が観察されたが、

100 mg/kg 投与群に異常は認められなかった。

雌では、4 mg/kg 投与群の不妊例の1匹（動物番号:FB02013）に、子宮および腔内腔の拡張が、未分娩例の1匹（動物番号:FB02008）に脾臓の暗色化、白色域の存在、被膜の白濁、表面粗造および濾胞の明瞭化が認められ、胃、肝臓および脾臓と癒着していた。また、肝臓の淡色化をともなう腫大、副腎、下顎リンパ節、縦隔リンパ節および腸間膜リンパ節の腫大、子宮内腔の拡張が認められた。

#### 5) 器官重量 (Table 11; Appendices 11-1~11-4)

下垂体、甲状腺および精巣の実重量および相対重量には、対照群と TSA 各投与群との間に有意差は認められなかった。精巣上体は、4 mg/kg 投与群の実重量および相対重量、100 mg/kg 投与群の実重量が対照群と比較して有意 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) に減少したが、20 mg/kg 投与群と対照群の間に差は認められなかった。

#### 6) 雄動物の病理組織所見 (Tables 12; Appendices 12-1~12-4)

対照群の3例（動物番号:MX01006、MX01008、MX01010）、4 mg/kg 投与群の2例（動物番号:MX02005、MX02007）および 100 mg/kg 投与群の3例（動物番号:MX04002、MX04003、MX04013）では、精細管の萎縮が認められた。これらの例では、精細管内の生殖細胞の減少、ライディッヒ細胞のびまん性の過形成、多核巨細胞、精巣上体管内の細胞残屑と精子数の減少が認められたが、いずれの所見も対照群と TSA 投与群との間で、発現頻度、程度とも差は認められなかった。

剖検時に腎盂拡張が観察された 20 mg/kg 投与群の雄1例（動物番号:MX03010）では、腎臓の髄質に硝子円柱が認められた。その他に、100 mg/kg 投与群の2例（動物番号:MX04006、MX04012）の下垂体にラトケ囊の嚢胞が、また、対照群と100 mg/kg 投与群の各1例（動物番号:MX01006、MX04003）の甲状腺に異所性の胸腺組織が認められた。

#### 7) 雌動物の病理組織所見 (Table 13 ; Appendices 13-1~13-4)

100 mg/kg 投与群において、卵巣に黄体嚢胞が1例（動物番号:FB04008）、下垂体にラトケ囊の拡張が1例（動物番号:FB04002）認められた他、対照群の2例（動物番号:FB01005、FB01007）、および、100 mg/kg 投与群の1例（動物番号:FB04005）の甲状腺に異所性の胸腺組織が認められたが、いずれも程度は軽く、発現頻度に差はみられなかった。

こと、使用した系統のラットでは、無処置の動物においてもみられる変化であることから、TSAの投与とは関係の無い変化であると考えられた。

剖検時に、脾臓と周囲組織の癒着が観察された、4 mg/kg 投与群の1匹（動物番号:FB02008）においては、脾臓に限局性の壊死および好中球の浸潤が認められ、癒着部位にはリンパ球、好中球、褐色色素を含んだマクロファージの浸潤が認められたほか、脾臓の壊死領域および癒着部位の一部に線維化も認められた。その他、脾臓には髓外造血および褐色色素の沈着も中等度に観察された。また、同例の肝臓には類洞内にクッパー細胞の増殖が認められたほか、下顎、縦隔、腸間膜リンパ節の髓洞にマクロファージ、髓索に形質細胞の増殖、肺には泡沫細胞の集簇が認められたが、腎臓、心臓、胃、大動脈、子宮および膣に異常は認められなかった。同じく剖検時に、子宮および膣に内腔の拡張が観察された4 mg/kg 投与群の1匹（動物番号:FB02013）では、子宮の粘膜上皮には細胞残屑を伴う空胞化や多数の好中球の浸潤が認められたほか、膣は嚢胞状に拡張し、粘膜上皮および粘膜固有層には好中球およびリンパ球の浸潤が認められたが、類似した変化は、他の投与群では観察されていないことから、TSAの投与とは関係の無い変化であると考えられた。

## 2. 生殖能力

### 1) 性周期および交配成績 (Tables 14, 15; Appendices 14-1~15-4)

性周期には TSA 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。交配検査の結果、交尾率および受胎率には TSA 投与の影響は認められなかった。また、交尾までの日数およびその間の発情数に、対照群と TSA 各投与群との間に有意差は認められなかった。なお、交尾が確認されなかった4 mg/kg 投与群の1匹（動物番号:FB02008）は、剖検時に着床痕が確認されたが、交尾した時期を特定することは出来なかった。

### 2) 出産率および妊娠期間 (Table 16; Appendices 16-1~16-4)

出産率および妊娠期間には TSA 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

### 3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 16; Appendices 16-1~16-4)

黄体数、着床数および着床率に TSA 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

#### 4) 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態の異常は1例も観察されなかった。

### 3. 出生児

#### 1) 生存性 (Table 16 ; Appendices 16-1~16-4)

出生率、産児数、分娩率、出產生児数、生児出産率、哺育4日の生児数、新生児生存率および性比には、対照群と TSA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 2) 体重 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

哺育0および4日における出生児の体重には、対照群と TSA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 3) 形態 (Table 18; Appendices 18-1~18-4)

哺育0日における生存児に外表奇形は観察されなかった。100 mg/kg 投与群において矮小児が1例 (母動物番号:FB04010) 認められた。この児は哺育4日まで生存し、剖検においても異常は認められなかった。この他に、100 mg/kg 投与群で尾端欠損 (母動物番号:FB04005)、左後肢血腫 (母動物番号:FB04009) がそれぞれ1例観察されたが、いずれも母動物による咬傷によるものと判断した。また、4 mg/kg 投与群で左頸部に皮下出血が1例 (母動物番号:FB02006) 認められた。

哺育4日の剖検では、100 mg/kg 投与群に尾端欠損 (母動物番号:FB04005)、左後肢欠損 (母動物番号:FB04009) がそれぞれ1例観察されたが、これらの児は、哺育0日の観察において尾端欠損、あるいは、左後肢血腫が観察された児であった。この他の児に異常は認められなかった。

対照群を含む全ての投与群において死亡児が散見されたが、観察可能だった死亡児についておこなった剖検では異常は認められなかった。また、対照群および100 mg/kg 投与群の哺育4日の生存児について実施した眼球の病理組織学的検査でも異常は認められなかった。

## 【考 察】

TSA の 4、20 および100 mg/kg を Sprague-Dawley 系ラットに雄には47日間、雌には交配前2週間および交配期間、妊娠期間を通して哺育3日まで経口投与し、TSA の生殖毒性について検討した。

その結果、雌雄ともに、一般症状の変化として、100 mg/kg 投与群において、投与後に活動性の低下と流涎が観察され、体重増加も抑制された。これらの変化は、先におこなわれた「 $\alpha$ -トルエンスルホンアミド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」<sup>1)</sup>の100 mg/kg 以上の投与群、および、本試験と同時期におこなった28日間反復経口投与毒性試験の100 mg/kg 投与群においても同様の変化が観察されたことから TSA の投与に起因した変化と考えられた。

剖検および病理組織学検査では、対照群ならびに低用量群の雄において、少数例で精巢の小型化が認められ、病理組織学的検査の結果、精細管の萎縮、精巢上体管内腔の細胞残屑の存在、ライディッヒ細胞のびまん性の過形成と精細管内の生殖細胞の減少が認められたが、その発現頻度、および程度に差はみられず、精巢上体重量が低下したものの、精巢重量には差は認められず、対照群にも認められる変化であること、「 $\alpha$ -トルエンスルホンアミド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」<sup>1)</sup>では、500 mg/kg までのTSA 投与によっても精巢上体重量の低下は認められていないことから、TSAの投与とは関係の無い変化であると考えられた。

雌の性周期、雌雄の交尾、受胎能、妊娠期間、および、出生児の生存性ならびに体重には、TSA 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

出生児の形態観察では、100 mg/kg 投与群において、尾端の切断および左後肢の血腫がそれぞれ1例みられたが、いずれも母動物によると考えられる咬傷が認められた。また、4 mg/kg 投与群の1例に頸部の皮下出血が認められたが、ラットの新生児では、よく観られる変化であること、20 mg/kg 以上の投与群では同様の変化は観察されていないことから、いずれもTSA 投与とは無関係であると判断した。また、対照群と100 mg/kg 投与群の児についておこなった眼球の病理検査においても異常は認められなかった。

以上の成績から、本試験条件下における $\alpha$ -トルエンスルホンアミドの親動物に対する無作用量は20 mg/kg/day、ただし親動物の生殖能力に対する無作用量は100 mg/kg/dayと考えられ、出生児に対する無作用量は100 mg/kg/dayと考えられる。

【文 献】

- 1) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修：「化学物質毒性試験報告書 vol 7」. 化学物質点検推進連絡協議会, 東京(1999) pp.134-152.
- 2) Lederer J. : La saccharine, ses polluants et leur effet tératogène. Louvain Méd. 96 : 495-501 (1977)



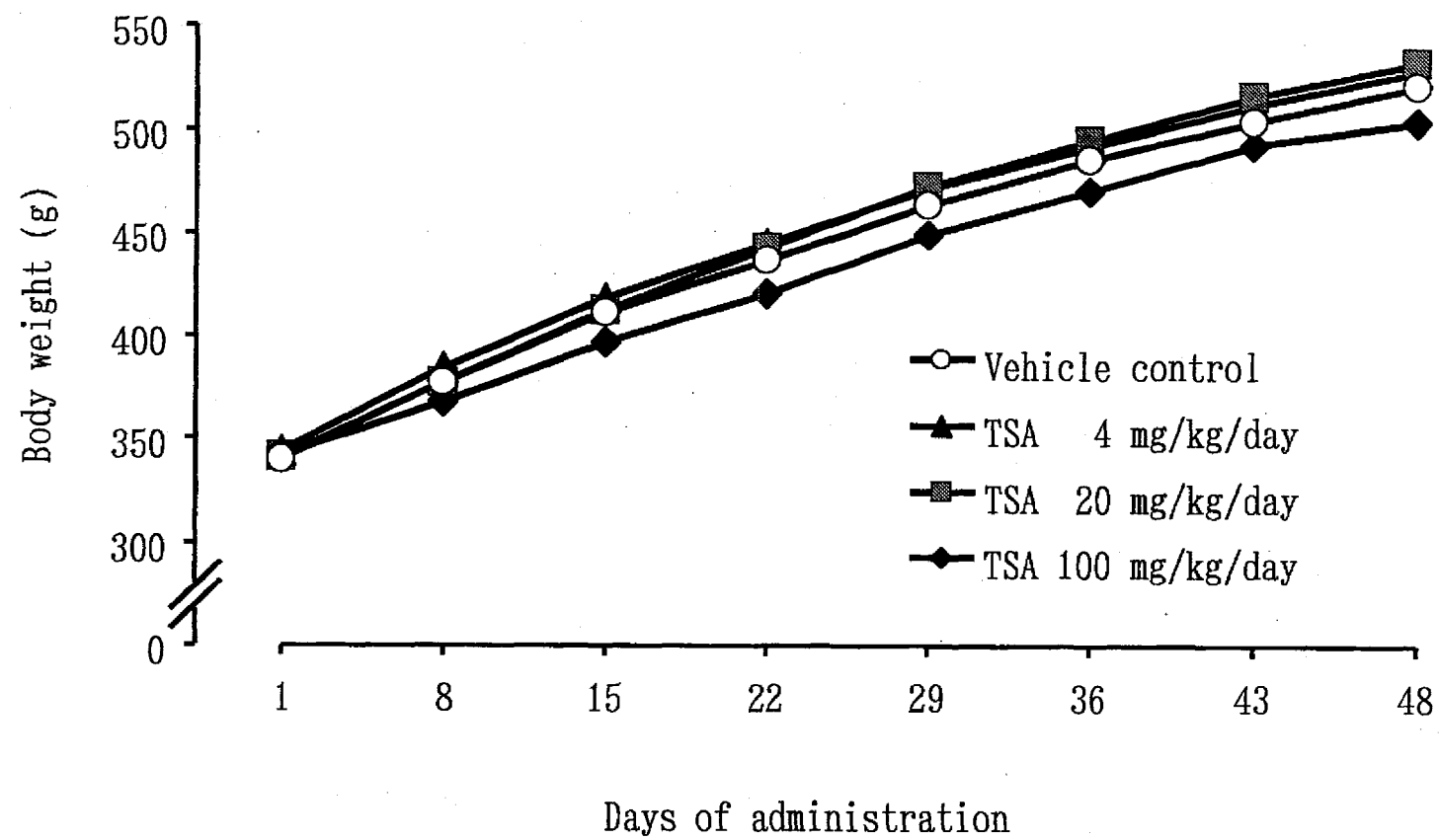


Fig1. Body weight of males

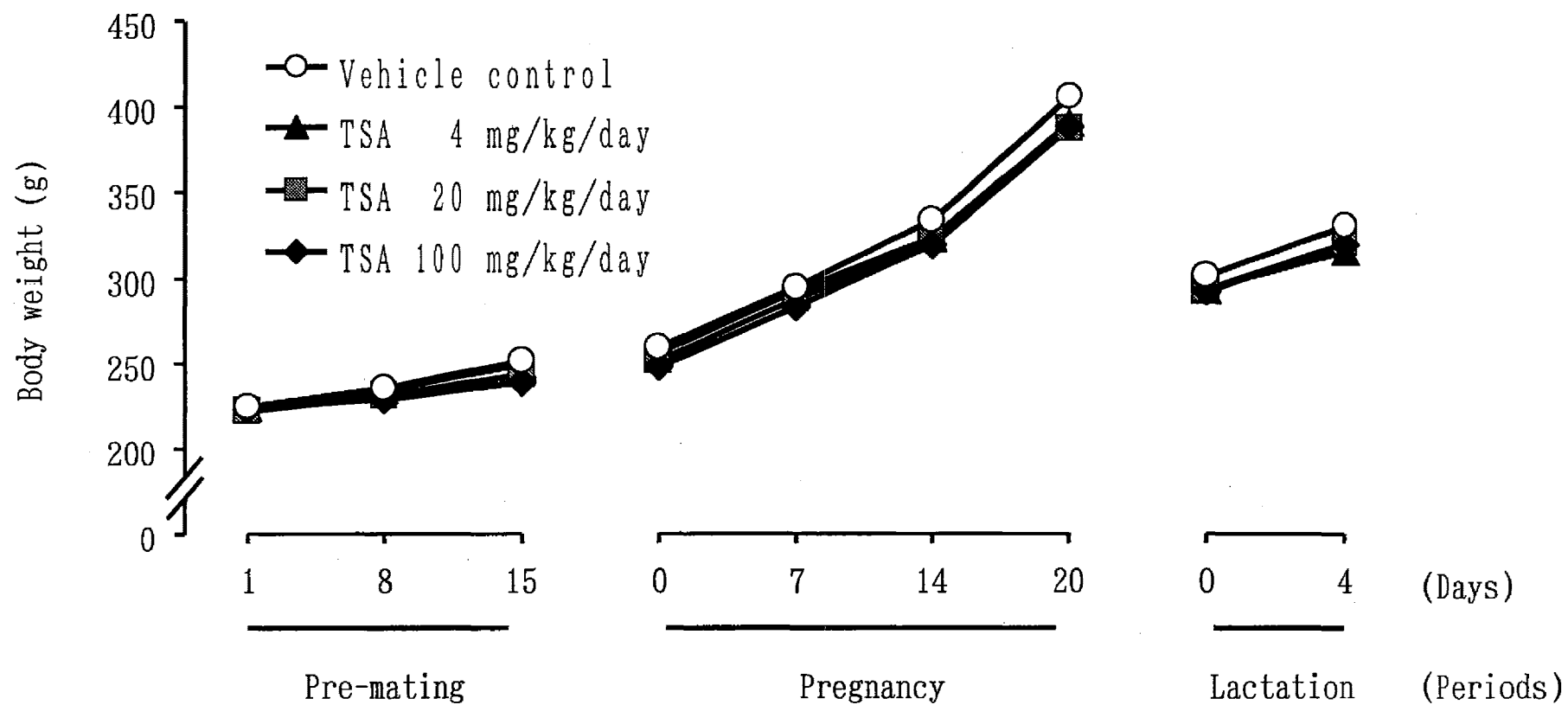


Fig2. Body weight of females

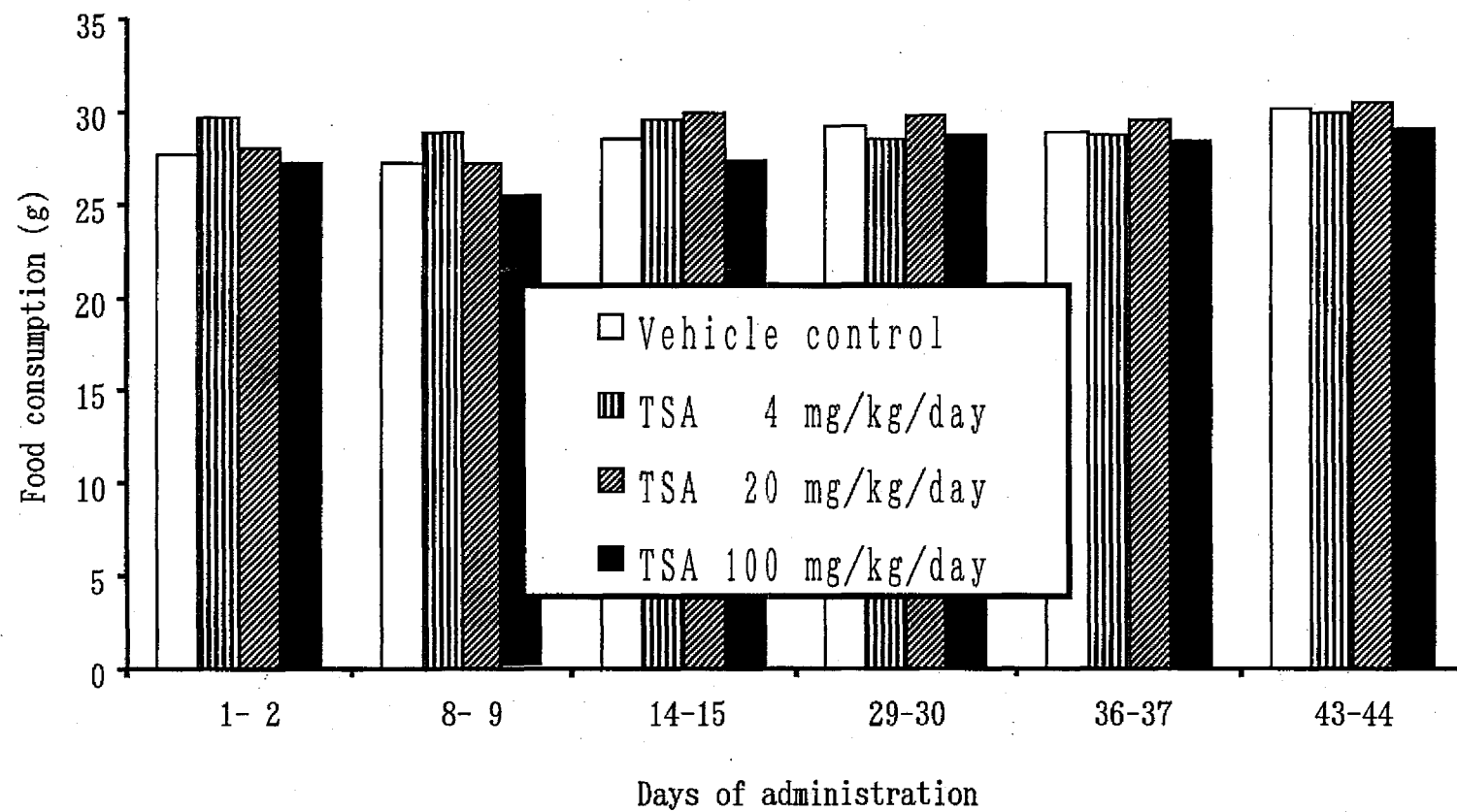


Fig3. Food consumption of males

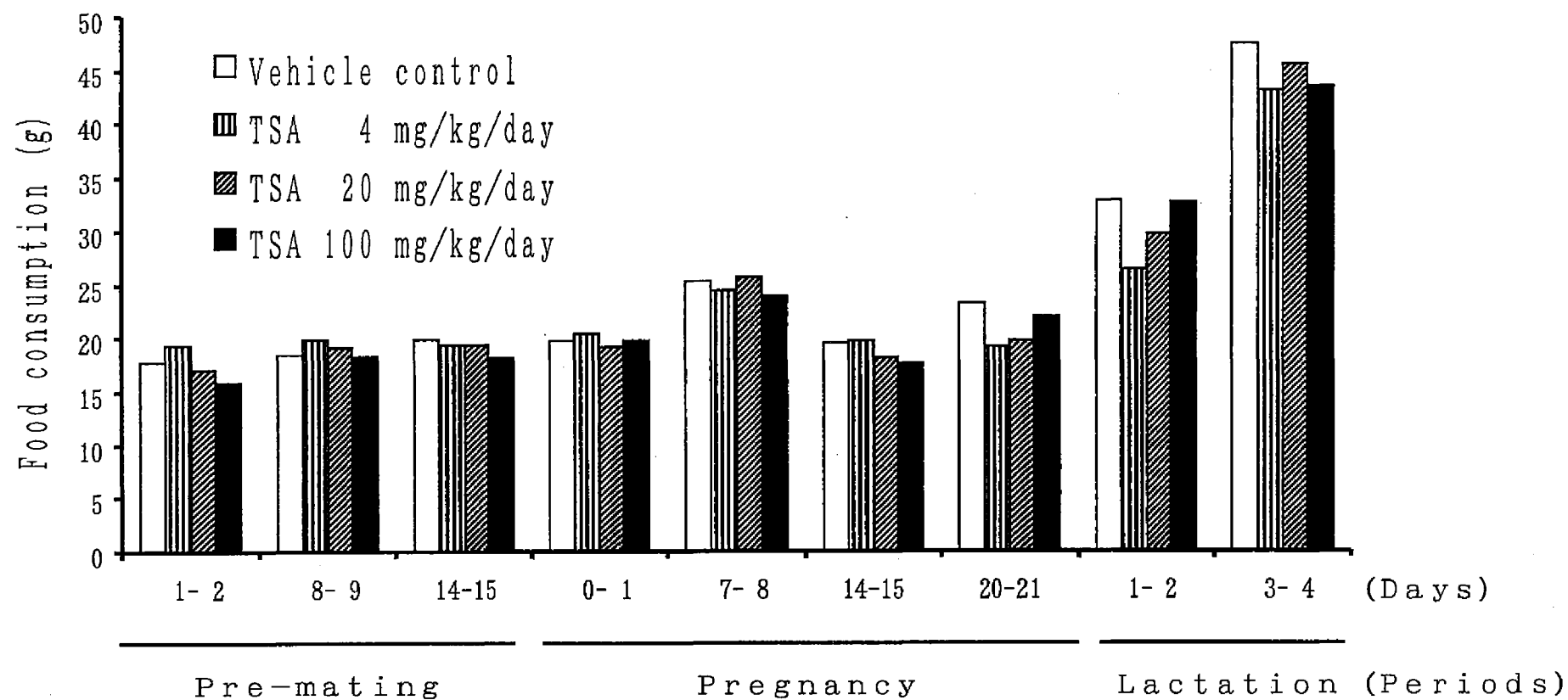


Fig4. Food consumption of females

# 【TABLE INDEX】

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

| TABLE ( APPENDIX ) | TABLE TITLE                                                     |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1 ( 1-1 ~ 1-4)     | Clinical signs of males                                         |
| 2 ( 2-1 ~ 2-4)     | Clinical signs of females                                       |
| 3 ( 3-1 ~ 3-4)     | Body weight of males                                            |
| 4 ( 4-1 ~ 4-4)     | Body weight gain of males                                       |
| 5 ( 5-1 ~ 5-4)     | Body weight of females                                          |
| 6 ( 6-1 ~ 6-4)     | Body weight gain of females                                     |
| 7 ( 7-1 ~ 7-4)     | Food consumption of males                                       |
| 8 ( 8-1 ~ 8-4)     | Food consumption of females                                     |
| 9 ( 9-1 ~ 9-4)     | Macroscopic findings in males at the end of dosing period       |
| 10 (10-1 ~10-4)    | Macroscopic findings in females at the end of dosing period     |
| 11 (11-1 ~11-4)    | Organ weight of F <sub>0</sub> males                            |
| 12 (12-1 ~12-4)    | Histopathological findings in males at the end of dosing period |
| 13 (13-1 ~13-4)    | Histopathological findings in females                           |
| 14 (14-1 ~14-4)    | Summary of estrous cycles                                       |
| 15 (15-1 ~15-4)    | Reproductive performance of animals                             |
| 16 (16-1 ~16-4)    | Development of pups up to day 4 of lactation                    |
| 17 (17-1 ~17-4)    | Body weight of pups up to day 4 of lactation                    |
| 18 (18-1 ~18-2)    | Histopathological findings in individual pups                   |

Table 1

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Clinical signs of males

| Compound<br>Dose group<br>(mg/kg) | TSA  |    |    |     |
|-----------------------------------|------|----|----|-----|
|                                   | 0 a) | 4  | 20 | 100 |
| No. of males examined             | 13   | 13 | 13 | 13  |
| No. of males with abnormality     | 0    | 1  | 1  | 13  |
| Category of abnormality; N        |      |    |    |     |
| Listless                          | 0    | 0  | 0  | 13  |
| Temporary salivation              | 0    | 0  | 0  | 12  |
| Reddish tear                      | 0    | 1  | 0  | 1   |
| Reddish urine                     | 0    | 0  | 1  | 0   |
| Loss of fur                       | 0    | 0  | 0  | 1   |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

Table 2

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Clinical signs of females

| Compound<br>Dose group<br>(mg/kg) | TSA  |    |    |     |
|-----------------------------------|------|----|----|-----|
|                                   | 0 a) | 4  | 20 | 100 |
| No. of females examined           | 13   | 13 | 13 | 13  |
| No. of females with abnormality   | 0    | 2  | 0  | 13  |
| Category of abnormality; N        |      |    |    |     |
| Listless                          | 0    | 0  | 0  | 13  |
| Temporary salivation              | 0    | 0  | 0  | 11  |
| Loss of fur                       | 0    | 2  | 0  | 0   |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

Table 3

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Body weight of males (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound                | TSA              |      |                  |      |                  |      |                  |      |
|-------------------------|------------------|------|------------------|------|------------------|------|------------------|------|
|                         | 0 a)             |      | 4                |      | 20               |      | 100              |      |
| Days of administration  |                  |      |                  |      |                  |      |                  |      |
| 1 (initial body weight) | 340.4 $\pm$ 14.2 | (13) | 344.3 $\pm$ 13.5 | (13) | 341.5 $\pm$ 14.0 | (13) | 341.8 $\pm$ 11.8 | (13) |
| 8                       | 377.4 $\pm$ 18.3 | (13) | 384.3 $\pm$ 19.0 | (13) | 377.0 $\pm$ 18.0 | (13) | 367.3 $\pm$ 18.9 | (13) |
| 15                      | 410.7 $\pm$ 25.2 | (13) | 418.3 $\pm$ 22.5 | (13) | 411.9 $\pm$ 21.3 | (13) | 396.5 $\pm$ 22.0 | (13) |
| 22                      | 436.3 $\pm$ 26.1 | (13) | 444.4 $\pm$ 24.4 | (13) | 442.4 $\pm$ 27.4 | (13) | 420.2 $\pm$ 27.2 | (13) |
| 29                      | 462.7 $\pm$ 27.4 | (13) | 471.0 $\pm$ 27.8 | (13) | 472.3 $\pm$ 31.7 | (13) | 448.4 $\pm$ 28.9 | (13) |
| 36                      | 485.8 $\pm$ 31.3 | (13) | 491.9 $\pm$ 29.9 | (13) | 495.1 $\pm$ 31.4 | (13) | 470.5 $\pm$ 32.4 | (13) |
| 43                      | 504.4 $\pm$ 33.1 | (13) | 512.5 $\pm$ 35.3 | (13) | 516.4 $\pm$ 31.7 | (13) | 492.9 $\pm$ 34.5 | (13) |
| 48                      | 521.4 $\pm$ 34.9 | (13) | 528.5 $\pm$ 38.8 | (13) | 532.4 $\pm$ 32.0 | (13) | 504.1 $\pm$ 36.3 | (13) |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)



Table 4

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Body weight gain of males (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound               | TSA                   |                       |                       |                         |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
|                        | 0 a)                  | 4                     | 20                    | 100                     |
| Days of administration |                       |                       |                       |                         |
| 1- 8                   | 37.0 $\pm$ 6.5 (13)   | 40.0 $\pm$ 8.2 (13)   | 35.5 $\pm$ 6.2 (13)   | 25.5 $\pm$ 11.0 ** (13) |
| 8-15                   | 33.3 $\pm$ 9.5 (13)   | 34.0 $\pm$ 6.2 (13)   | 34.9 $\pm$ 6.5 (13)   | 29.1 $\pm$ 6.0 (13)     |
| 15-22                  | 25.6 $\pm$ 5.6 (13)   | 26.2 $\pm$ 6.1 (13)   | 30.5 $\pm$ 9.3 (13)   | 23.8 $\pm$ 6.9 (13)     |
| 22-29                  | 26.3 $\pm$ 4.8 (13)   | 26.6 $\pm$ 4.9 (13)   | 29.9 $\pm$ 6.2 (13)   | 28.2 $\pm$ 5.7 (13)     |
| 29-36                  | 23.1 $\pm$ 6.2 (13)   | 20.9 $\pm$ 4.3 (13)   | 22.7 $\pm$ 4.6 (13)   | 22.1 $\pm$ 6.6 (13)     |
| 36-43                  | 18.6 $\pm$ 4.3 (13)   | 20.6 $\pm$ 7.9 (13)   | 21.4 $\pm$ 6.1 (13)   | 22.5 $\pm$ 5.0 (13)     |
| 43-48                  | 17.0 $\pm$ 4.9 (13)   | 16.1 $\pm$ 5.5 (13)   | 15.9 $\pm$ 4.8 (13)   | 11.2 $\pm$ 4.9 * (13)   |
| 1-15                   | 70.3 $\pm$ 15.0 (13)  | 74.0 $\pm$ 11.3 (13)  | 70.4 $\pm$ 10.9 (13)  | 54.6 $\pm$ 15.7 * (13)  |
| 1-22                   | 95.9 $\pm$ 16.6 (13)  | 100.1 $\pm$ 14.0 (13) | 100.9 $\pm$ 16.3 (13) | 78.4 $\pm$ 20.8 * (13)  |
| 1-29                   | 122.3 $\pm$ 18.3 (13) | 126.7 $\pm$ 16.8 (13) | 130.8 $\pm$ 21.2 (13) | 106.6 $\pm$ 22.1 (13)   |
| 1-36                   | 145.4 $\pm$ 22.6 (13) | 147.6 $\pm$ 18.6 (13) | 153.5 $\pm$ 21.9 (13) | 128.6 $\pm$ 25.3 (13)   |
| 1-43                   | 164.0 $\pm$ 24.0 (13) | 168.2 $\pm$ 24.0 (13) | 174.9 $\pm$ 23.1 (13) | 151.1 $\pm$ 27.3 (13)   |
| 1-48                   | 181.0 $\pm$ 25.9 (13) | 184.2 $\pm$ 27.6 (13) | 190.8 $\pm$ 24.2 (13) | 162.3 $\pm$ 29.8 (13)   |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

\* : Significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)\*\* : Significant difference from control,  $p < 0.01$  (by multiple comparisons)

Table 5

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Body weight of females (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound               | TSA              |      |  |                  |      |  |                  |      |  |                    |      |  |
|------------------------|------------------|------|--|------------------|------|--|------------------|------|--|--------------------|------|--|
|                        | 0 a)             |      |  | 4                |      |  | 20               |      |  | 100                |      |  |
| Days of administration |                  |      |  |                  |      |  |                  |      |  |                    |      |  |
| 1                      | 224.2 $\pm$ 7.4  | (13) |  | 225.0 $\pm$ 8.6  | (13) |  | 223.0 $\pm$ 6.8  | (13) |  | 223.2 $\pm$ 7.1    | (13) |  |
| 8                      | 236.1 $\pm$ 8.3  | (13) |  | 235.2 $\pm$ 11.2 | (13) |  | 231.5 $\pm$ 6.7  | (13) |  | 229.0 $\pm$ 9.2    | (13) |  |
| 15                     | 251.0 $\pm$ 10.4 | (13) |  | 249.8 $\pm$ 14.8 | (13) |  | 243.9 $\pm$ 8.4  | (13) |  | 238.8 $\pm$ 10.1 * | (13) |  |
| Days of pregnancy      |                  |      |  |                  |      |  |                  |      |  |                    |      |  |
| 0                      | 259.3 $\pm$ 11.2 | (12) |  | 255.4 $\pm$ 14.7 | (9)  |  | 251.6 $\pm$ 12.7 | (11) |  | 248.1 $\pm$ 12.6   | (11) |  |
| 7                      | 294.3 $\pm$ 10.5 | (12) |  | 291.2 $\pm$ 13.9 | (9)  |  | 286.7 $\pm$ 11.8 | (11) |  | 282.2 $\pm$ 12.5   | (11) |  |
| 14                     | 333.3 $\pm$ 13.1 | (12) |  | 323.0 $\pm$ 18.6 | (9)  |  | 322.3 $\pm$ 12.3 | (11) |  | 318.7 $\pm$ 15.2   | (11) |  |
| 20                     | 405.2 $\pm$ 20.8 | (12) |  | 390.1 $\pm$ 34.7 | (9)  |  | 386.0 $\pm$ 17.6 | (11) |  | 387.8 $\pm$ 17.8   | (11) |  |
| Days of lactation      |                  |      |  |                  |      |  |                  |      |  |                    |      |  |
| 0                      | 300.6 $\pm$ 18.2 | (12) |  | 292.8 $\pm$ 17.8 | (9)  |  | 293.0 $\pm$ 19.7 | (11) |  | 291.1 $\pm$ 26.8   | (11) |  |
| 4                      | 329.2 $\pm$ 14.2 | (12) |  | 315.2 $\pm$ 15.1 | (9)  |  | 319.8 $\pm$ 12.9 | (11) |  | 318.7 $\pm$ 19.7   | (11) |  |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

\* : Significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)

Table 6

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Body weight gain of females (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound               |                  | TSA  |  |                  |      |  |  |                  |      |  |  |                   |      |
|------------------------|------------------|------|--|------------------|------|--|--|------------------|------|--|--|-------------------|------|
| Groups (mg/kg)         | 0 a)             |      |  | 4                |      |  |  |                  | 20   |  |  |                   | 100  |
| Days of administration |                  |      |  |                  |      |  |  |                  |      |  |  |                   |      |
| 1- 8                   | 12.0 $\pm$ 6.6   | (13) |  | 10.1 $\pm$ 8.4   | (13) |  |  | 8.4 $\pm$ 5.4    | (13) |  |  | 5.8 $\pm$ 5.6     | (13) |
| 8-15                   | 14.9 $\pm$ 7.0   | (13) |  | 14.7 $\pm$ 7.4   | (13) |  |  | 12.4 $\pm$ 6.0   | (13) |  |  | 9.8 $\pm$ 4.6     | (13) |
| 1-15                   | 26.9 $\pm$ 8.2   | (13) |  | 24.8 $\pm$ 11.9  | (13) |  |  | 20.9 $\pm$ 7.9   | (13) |  |  | 15.6 $\pm$ 8.1 ** | (13) |
| Days of pregnancy      |                  |      |  |                  |      |  |  |                  |      |  |  |                   |      |
| 0- 7                   | 35.0 $\pm$ 4.8   | (12) |  | 35.8 $\pm$ 4.4   | (9)  |  |  | 35.1 $\pm$ 6.6   | (11) |  |  | 34.1 $\pm$ 4.5    | (11) |
| 7-14                   | 39.1 $\pm$ 6.5   | (12) |  | 31.8 $\pm$ 6.5   | (9)  |  |  | 35.6 $\pm$ 5.5   | (11) |  |  | 36.6 $\pm$ 5.9    | (11) |
| 14-20                  | 71.8 $\pm$ 11.1  | (12) |  | 67.1 $\pm$ 18.1  | (9)  |  |  | 63.6 $\pm$ 12.5  | (11) |  |  | 69.1 $\pm$ 4.2    | (11) |
| 0-14                   | 74.1 $\pm$ 6.5   | (12) |  | 67.6 $\pm$ 6.8   | (9)  |  |  | 70.7 $\pm$ 8.1   | (11) |  |  | 70.6 $\pm$ 8.4    | (11) |
| 0-20                   | 145.9 $\pm$ 15.6 | (12) |  | 134.7 $\pm$ 22.8 | (9)  |  |  | 134.3 $\pm$ 14.0 | (11) |  |  | 139.7 $\pm$ 10.5  | (11) |
| Days of lactation      |                  |      |  |                  |      |  |  |                  |      |  |  |                   |      |
| 0- 4                   | 28.6 $\pm$ 12.8  | (12) |  | 22.4 $\pm$ 13.9  | (9)  |  |  | 26.8 $\pm$ 11.8  | (11) |  |  | 27.6 $\pm$ 9.8    | (11) |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

Table 7

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Food consumption of males (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound               |  | TSA        |      |            |      |            |      |            |      |
|------------------------|--|------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|
| Groups (mg/kg)         |  | 0 a)       |      | 4          |      | 20         |      | 100        |      |
| Days of administration |  |            |      |            |      |            |      |            |      |
| 1- 2                   |  | 27.7 ± 2.5 | (13) | 29.6 ± 2.6 | (13) | 28.0 ± 2.9 | (13) | 27.2 ± 1.6 | (13) |
| 8- 9                   |  | 27.2 ± 2.4 | (13) | 28.8 ± 2.5 | (13) | 27.2 ± 2.3 | (13) | 25.2 ± 2.7 | (13) |
| 14-15                  |  | 28.5 ± 3.2 | (13) | 29.5 ± 2.3 | (13) | 29.9 ± 2.5 | (13) | 27.3 ± 2.0 | (13) |
| 29-30                  |  | 29.2 ± 3.1 | (13) | 28.5 ± 2.1 | (13) | 29.7 ± 3.1 | (13) | 28.7 ± 2.8 | (13) |
| 36-37                  |  | 28.8 ± 2.6 | (13) | 28.7 ± 1.9 | (13) | 29.5 ± 2.5 | (13) | 28.4 ± 3.6 | (13) |
| 43-44                  |  | 30.1 ± 3.2 | (13) | 29.9 ± 3.0 | (13) | 30.4 ± 3.2 | (13) | 29.0 ± 4.1 | (13) |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

Table 8

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Food consumption of females (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound<br>Groups (mg/kg) | TSA                 |                     |                       |                     |
|----------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
|                            | 0 a)                | 4                   | 20                    | 100                 |
| Days of administration     |                     |                     |                       |                     |
| 1- 2                       | 17.8 $\pm$ 1.9 (13) | 19.3 $\pm$ 2.1 (13) | 17.1 $\pm$ 3.5 (13)   | 15.9 $\pm$ 2.7 (13) |
| 8- 9                       | 18.4 $\pm$ 3.0 (13) | 19.8 $\pm$ 2.3 (13) | 19.1 $\pm$ 2.4 (13)   | 18.3 $\pm$ 2.6 (13) |
| 14-15                      | 19.9 $\pm$ 2.8 (13) | 19.3 $\pm$ 3.9 (13) | 19.3 $\pm$ 2.9 (13)   | 18.2 $\pm$ 2.5 (13) |
| Days of pregnancy          |                     |                     |                       |                     |
| 0- 1                       | 19.7 $\pm$ 2.5 (12) | 20.3 $\pm$ 2.9 (9)  | 19.1 $\pm$ 2.3 (11)   | 19.7 $\pm$ 3.0 (11) |
| 7- 8                       | 25.2 $\pm$ 2.0 (12) | 24.4 $\pm$ 2.4 (9)  | 25.6 $\pm$ 3.0 (11)   | 23.8 $\pm$ 2.5 (11) |
| 14-15                      | 19.5 $\pm$ 2.3 (12) | 19.6 $\pm$ 1.7 (9)  | 18.1 $\pm$ 4.4 (11)   | 17.6 $\pm$ 3.2 (11) |
| 20-21                      | 23.1 $\pm$ 2.8 (12) | 19.2 $\pm$ 5.7 (9)  | 19.6 $\pm$ 2.8 * (11) | 21.9 $\pm$ 2.5 (11) |
| Days of lactation          |                     |                     |                       |                     |
| 1- 2                       | 32.7 $\pm$ 4.2 (12) | 26.3 $\pm$ 8.1 (9)  | 29.6 $\pm$ 4.4 (11)   | 32.5 $\pm$ 6.4 (11) |
| 3- 4                       | 47.3 $\pm$ 6.2 (12) | 43.1 $\pm$ 8.6 (9)  | 45.5 $\pm$ 5.2 (11)   | 43.3 $\pm$ 3.4 (11) |

a): vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

\* : Significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)

Table 9

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Macroscopic findings in males at the end of dosing period.

| Compound<br>Groups (mg/kg)<br>Grade     | TSA  |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |
|-----------------------------------------|------|----|---|------|----|---|------|----|---|------|----|---|
|                                         | 0 a) |    |   | 4    |    |   | 20   |    |   | 100  |    |   |
|                                         | [N]  | -  | + | [N]  | -  | + | [N]  | -  | + | [N]  | -  | + |
| Testis                                  | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   |
| Small, left side                        |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Small, bilateral                        |      | 13 | 0 |      | 11 | 2 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Kidney                                  | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   |
| Dilatation, renal pelvis,<br>right side |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)    -: Negative  
 +: Positive

Table 10

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Macroscopic findings in females at the end of dosing period

| Compound<br>Groups (mg/kg)<br>Grade       | TSA  |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |
|-------------------------------------------|------|----|---|------|----|---|------|----|---|------|----|---|
|                                           | 0 a) |    |   | 4    |    |   | 20   |    |   | 100  |    |   |
|                                           | [N]  | -  | + | [N]  | -  | + | [N]  | -  | + | [N]  | -  | + |
| Uterus                                    | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   |
| Dilatation, lumen                         |      | 13 | 0 |      | 11 | 2 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Vagina                                    | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   |
| Dilatation, lumen                         |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Spleen                                    | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   |
| Accentuated follicle                      |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Rough surface                             |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Dark                                      |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Area, white                               |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Whitish cloudy, capsule                   |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Adhesion [with stomach, liver & pancreas] |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Liver                                     | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   |
| Enlargement                               |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Pale                                      |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Adrenal gland                             | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   |
| Enlargement                               |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Mandibular lymph node                     | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   |
| Enlargement                               |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Mesentric lymph node                      | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   |
| Enlargement                               |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |
| Mediastinal lymph node                    | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   | [13] |    |   |
| Enlargement                               |      | 13 | 0 |      | 12 | 1 |      | 13 | 0 |      | 13 | 0 |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solition (5 mL/kg)

-: Negative  
+: Positive

Table 11

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Organ weight of males, Mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          |         | TSA                    |      |                        |      |                     |      |                        |      |
|-------------------|---------|------------------------|------|------------------------|------|---------------------|------|------------------------|------|
|                   |         | 0 a)                   |      | 4                      |      | 20                  |      | 100                    |      |
| Groups            | (mg/kg) |                        |      |                        |      |                     |      |                        |      |
| Final body weight | (g)     | 521.4 $\pm$ 34.9       | (13) | 528.5 $\pm$ 38.8       | (13) | 532.4 $\pm$ 32.0    | (13) | 504.1 $\pm$ 36.3       | (13) |
| Pituitary         | (g)     | 0.0127 $\pm$ 0.0018 b) | (13) | 0.0113 $\pm$ 0.0019    | (13) | 0.0123 $\pm$ 0.0011 | (13) | 0.0116 $\pm$ 0.0016    | (13) |
|                   |         | 0.0024 $\pm$ 0.0003 c) | (13) | 0.0021 $\pm$ 0.0003    | (13) | 0.0023 $\pm$ 0.0002 | (13) | 0.0023 $\pm$ 0.0003    | (13) |
| Thyroid           | (g)     | 0.0235 $\pm$ 0.0038    | (13) | 0.0233 $\pm$ 0.0030    | (13) | 0.0247 $\pm$ 0.0061 | (13) | 0.0249 $\pm$ 0.0037    | (13) |
|                   |         | 0.0045 $\pm$ 0.0006    | (13) | 0.0044 $\pm$ 0.0006    | (13) | 0.0046 $\pm$ 0.0011 | (13) | 0.0050 $\pm$ 0.0008    | (13) |
| Testes            | (g)     | 3.1259 $\pm$ 0.4096    | (13) | 2.8107 $\pm$ 0.6476    | (13) | 3.2625 $\pm$ 0.1889 | (13) | 3.2065 $\pm$ 0.2422    | (13) |
|                   |         | 0.6013 $\pm$ 0.0843    | (13) | 0.5353 $\pm$ 0.1322    | (13) | 0.6143 $\pm$ 0.0418 | (13) | 0.6401 $\pm$ 0.0761    | (13) |
| Epididymides      | (g)     | 1.1838 $\pm$ 0.1587    | (13) | 1.0209 $\pm$ 0.1791 ** | (13) | 1.1473 $\pm$ 0.0842 | (13) | 1.0761 $\pm$ 0.0646 ** | (13) |
|                   |         | 0.2277 $\pm$ 0.0321    | (13) | 0.1944 $\pm$ 0.0385 *  | (13) | 0.2160 $\pm$ 0.0185 | (13) | 0.2147 $\pm$ 0.0226    | (13) |

a): vehicle control; 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

b): absolute weight

c): relative weight (g 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 12

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Histopathological findings in males at the end of dosing period

| Compound<br>Groups (mg/kg)<br>Grade               | TSA        |    |     |   |    |     |      |         |   |     |   |    |     |      |          |   |     |   |    |     |      |           |    |     |   |    |     |      |
|---------------------------------------------------|------------|----|-----|---|----|-----|------|---------|---|-----|---|----|-----|------|----------|---|-----|---|----|-----|------|-----------|----|-----|---|----|-----|------|
|                                                   | 0 mg/kg a) |    |     |   |    |     |      | 4 mg/kg |   |     |   |    |     |      | 20 mg/kg |   |     |   |    |     |      | 100 mg/kg |    |     |   |    |     |      |
|                                                   | [N]        | -  | +/- | + | ++ | +++ | Pos. | [N]     | - | +/- | + | ++ | +++ | Pos. | [N]      | - | +/- | + | ++ | +++ | Pos. | [N]       | -  | +/- | + | ++ | +++ | Pos. |
| Pituitary gland                                   | [13]       |    |     |   |    |     |      | [ 0]    |   |     |   |    |     |      | [ 0]     |   |     |   |    |     |      | [13]      |    |     |   |    |     |      |
| Cyst, Rathke's pouch                              |            | 13 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |         |   |     |   |    |     |      |          |   |     |   |    |     |      |           | 11 | 2   | 0 | 0  | 0   | 2    |
| Thyroid gland                                     | [13]       |    |     |   |    |     |      | [ 0]    |   |     |   |    |     |      | [ 0]     |   |     |   |    |     |      | [13]      |    |     |   |    |     |      |
| Ectopic thymus                                    |            | 12 | 1   | 0 | 0  | 0   | 1    |         |   |     |   |    |     |      |          |   |     |   |    |     |      |           | 12 | 0   | 1 | 0  | 0   | 1    |
| Testis                                            | [13]       |    |     |   |    |     |      | [ 2]    |   |     |   |    |     |      | [ 0]     |   |     |   |    |     |      | [13]      |    |     |   |    |     |      |
| Atrophy, seminiferous tubule,<br>bilateral        |            | 11 | 1   | 0 | 1  | 0   | 2    |         | 0 | 0   | 0 | 2  | 0   | 2    |          |   |     |   |    |     |      |           | 10 | 2   | 1 | 0  | 0   | 3    |
| Atrophy, seminiferous tubule,<br>unilateral       |            | 12 | 1   | 0 | 0  | 0   | 1    |         | 2 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |          |   |     |   |    |     |      |           | 13 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |
| Decrease, germ cell,<br>seminiferous tubule       |            | 12 | 0   | 0 | 1  | 0   | 1    |         | 0 | 0   | 0 | 2  | 0   | 2    |          |   |     |   |    |     |      |           | 10 | 2   | 1 | 0  | 0   | 3    |
| Multinucleated giant cell,<br>seminiferous tubule |            | 12 | 1   | 0 | 0  | 0   | 1    |         | 1 | 0   | 1 | 0  | 0   | 1    |          |   |     |   |    |     |      |           | 12 | 0   | 1 | 0  | 0   | 1    |
| Hyperplasia, Leydig cell,<br>diffuse              |            | 12 | 0   | 1 | 0  | 0   | 1    |         | 0 | 0   | 2 | 0  | 0   | 2    |          |   |     |   |    |     |      |           | 13 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |
| Epididymis                                        | [13]       |    |     |   |    |     |      | [ 2]    |   |     |   |    |     |      | [ 0]     |   |     |   |    |     |      | [13]      |    |     |   |    |     |      |
| Cell debris, lumen                                |            | 11 | 1   | 0 | 1  | 0   | 2    |         | 0 | 0   | 0 | 1  | 1   | 2    |          |   |     |   |    |     |      |           | 10 | 2   | 1 | 0  | 0   | 3    |
| Decrease, sperm, lumen                            |            | 12 | 0   | 0 | 1  | 0   | 1    |         | 0 | 0   | 0 | 1  | 1   | 2    |          |   |     |   |    |     |      |           | 13 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |
| Kidney: right side                                | [ 0]       |    |     |   |    |     |      | [ 0]    |   |     |   |    |     |      | [ 1]     |   |     |   |    |     |      | [ 0]      |    |     |   |    |     |      |
| Dilatation, renal pelvis                          |            |    |     |   |    |     |      |         |   |     |   |    |     |      |          | 0 | 0   | 1 | 0  | 0   | 1    |           |    |     |   |    |     |      |
| Hyalin cast, medulla                              |            |    |     |   |    |     |      |         |   |     |   |    |     |      |          | 0 | 1   | 0 | 0  | 0   | 1    |           |    |     |   |    |     |      |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

- : Negative  
 +/-: Very slight  
 + : Slight  
 ++ : Moderate  
 +++: Severe

Pos.: Total of positive grade

Table 13 - 1

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Histopathological findings in females (Subject to autopsy on day 4 of lactation)

| Compound<br>Groups (mg/kg)<br>Grade | TSA  |    |     |   |    |     |      |     |   |     |   |    |     |      |     |   |     |   |     |     |      |      |    |     |   |    |     |      |
|-------------------------------------|------|----|-----|---|----|-----|------|-----|---|-----|---|----|-----|------|-----|---|-----|---|-----|-----|------|------|----|-----|---|----|-----|------|
|                                     | 0 a) |    |     |   |    |     | 4    |     |   |     |   |    | 20  |      |     |   |     |   | 100 |     |      |      |    |     |   |    |     |      |
|                                     | [N]  | -  | +/- | + | ++ | +++ | Pos. | [N] | - | +/- | + | ++ | +++ | Pos. | [N] | - | +/- | + | ++  | +++ | Pos. | [N]  | -  | +/- | + | ++ | +++ | Pos. |
| Pituitary gland                     | [12] |    |     |   |    |     |      | [0] |   |     |   |    |     |      | [0] |   |     |   |     |     |      | [11] |    |     |   |    |     |      |
| Dilatation, Rathke's pouch          |      | 12 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |     |   |     |   |    |     |      |     |   |     |   |     |     |      |      | 10 | 0   | 1 | 0  | 0   | 1    |
| Thyroid gland                       | [12] |    |     |   |    |     |      | [0] |   |     |   |    |     |      | [0] |   |     |   |     |     |      | [11] |    |     |   |    |     |      |
| Ectopic thymus                      |      | 10 | 1   | 1 | 0  | 0   | 2    |     |   |     |   |    |     |      |     |   |     |   |     |     |      |      | 10 | 1   | 0 | 0  | 0   | 1    |
| Ovary                               | [12] |    |     |   |    |     |      | [0] |   |     |   |    |     |      | [0] |   |     |   |     |     |      | [11] |    |     |   |    |     |      |
| Cyst, corpus luteum                 |      | 12 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |     |   |     |   |    |     |      |     |   |     |   |     |     |      |      | 10 | 1   | 0 | 0  | 0   | 1    |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

- : Negative  
 +/-: Very slight  
 + : Slight  
 ++ : Moderate  
 +++: Severe

Pos.: Total of positive grade

Table 13 - 2

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Histopathological findings in females (Non-pregnant and Complete litter loss)

| Compound Groups (mg/kg)<br>Grade                                            | 0 a) |   |     |   |    |     | TSA  |      |   |     |   |    | 20  |      |      |   |     |   | 100 |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
|-----------------------------------------------------------------------------|------|---|-----|---|----|-----|------|------|---|-----|---|----|-----|------|------|---|-----|---|-----|-----|------|------|---|-----|---|----|-----|------|
|                                                                             | [N]  | - | +/- | + | ++ | +++ | Pos. | [N]  | - | +/- | + | ++ | +++ | Pos. | [N]  | - | +/- | + | ++  | +++ | Pos. | [N]  | - | +/- | + | ++ | +++ | Pos. |
| Pituitary gland                                                             | [ 1] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 2] |   |     |   |    |     |      |
| Dilatation, Rathke's pouch                                                  |      | 1 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |      |   |     |   |    |     |      |      |   |     |   |     |     |      |      | 2 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |
| Thyroid gland                                                               | [ 1] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 2] |   |     |   |    |     |      |
| Ectopic thymus                                                              |      | 1 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |      |   |     |   |    |     |      |      |   |     |   |     |     |      |      | 2 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |
| Ovary                                                                       | [ 1] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 2] |   |     |   |    |     |      |
| Cyst, corpus luteum                                                         |      | 1 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |      |   |     |   |    |     |      |      |   |     |   |     |     |      |      | 2 | 0   | 0 | 0  | 0   | 0    |
| Uterus                                                                      | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 2] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      |
| Dilatation, lumen                                                           |      |   |     |   |    |     |      | 1    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Cellular infiltration, neutrophil, luminal epithelium                       |      |   |     |   |    |     |      | 1    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Vacuolation, with cell debris, luminal epithelium                           |      |   |     |   |    |     |      | 1    | 0 | 0   | 0 | 1  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Vagina                                                                      | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 2] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      |
| Dilatation, cystic, lumen                                                   |      |   |     |   |    |     |      | 1    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Cellular infiltration, neutrophil & lymphocyte, epithelium & lamina propria |      |   |     |   |    |     |      | 1    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Spleen                                                                      | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 1] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      |
| Necrosis, focal                                                             |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Fibrosis, necrotized area                                                   |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 1   | 0 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Cellular infiltration, neutrophil                                           |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Fibrosis, adhesional area                                                   |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 1   | 0 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Cellular infiltration, neutrophil & lymphocyte, adhesional area             |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Cellular infiltration, macrophage, with brown pigment, adhesional area      |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Hematopoiesis, extramedullary                                               |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Deposit, pigment, brown                                                     |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Liver                                                                       | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 1] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      |
| Proliferation, Kupffer cell, sinusoid                                       |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Mandibular lymph node                                                       | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 1] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      |
| Proliferation, macrophage, sinus, medulla                                   |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Proliferation, plasma cell, medullary cord                                  |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Mediastinal lymph node                                                      | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 1] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      |
| Proliferation, macrophage, sinus, medulla                                   |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Proliferation, plasma cell, medullary cord                                  |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Mesenteric lymph node                                                       | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 1] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      |
| Proliferation, macrophage, sinus, medulla                                   |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Proliferation, plasma cell, medullary cord                                  |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 0 | 0   | 1 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Lung                                                                        | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 1] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      |
| Accumulation, foam cell                                                     |      |   |     |   |    |     |      | 0    | 1 | 0   | 0 | 0  |     | 1    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |
| Other organs                                                                | [ 0] |   |     |   |    |     |      | [ 1] |   |     |   |    |     |      | [ 0] |   |     |   |     |     |      | [ 0] |   |     |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                        |      |   |     |   |    |     |      | 1    | 0 | 0   | 0 | 0  |     | 0    |      |   |     |   |     |     |      |      |   |     |   |    |     |      |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

Other organs: Adrenal gland, Heart, Aorta, Stomach, Kidney

- : Negative  
 +/-: Very slight  
 + : Slight  
 ++ : Moderate  
 +++: Severe

Pos.: Total of positive grade

Table 14

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Summary of estrous cycles

| Compound<br>Dose group<br>(mg/kg)                                        | TSA                |                    |                    |                    |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                                                          | 0 a)               | 4                  | 20                 | 100                |
| Number of females examined                                               | 13                 | 13                 | 13                 | 13                 |
| Mean length of estrous cycle in days                                     |                    |                    |                    |                    |
| Pre-treatment period; Mean $\pm$ S.D                                     | 4.0 $\pm$ 0.0      | 4.0 $\pm$ 0.0      | 4.0 $\pm$ 0.0      | 4.0 $\pm$ 0.0      |
| Treatment period; Mean $\pm$ S.D.                                        | 4.0 $\pm$ 0.1      | 4.1 $\pm$ 0.3      | 4.0 $\pm$ 0.0      | 4.1 $\pm$ 0.3      |
| Number of animals showing each type of cycle during pre-treatment period |                    |                    |                    |                    |
| 4-day cycle                                                              | 13                 | 13                 | 13                 | 13                 |
| Changes of estrous cycle after treatment                                 |                    |                    |                    |                    |
| Number of animals not changed                                            | 12                 | 11                 | 13                 | 12                 |
| Number of animals changed                                                |                    |                    |                    |                    |
| (pre-treatment period) (treatment period)                                |                    |                    |                    |                    |
| 4-day $\rightarrow$ 5-day                                                | 0                  | 0                  | 0                  | 1                  |
| 4-day $\rightarrow$ 4,5-day                                              | 1                  | 1                  | 0                  | 0                  |
| 4-day $\rightarrow$ irregular                                            | 0                  | 1                  | 0                  | 0                  |
| Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean $\pm$ S.D. (N)   | 1.0 $\pm$ 0.0 (13) | 1.0 $\pm$ 0.0 (11) | 1.0 $\pm$ 0.0 (12) | 1.0 $\pm$ 0.0 (13) |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

Table 15

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Reproductive performance of animals

| Compound                      | TSA                |                    |                    |                    |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Dose group<br>(mg/kg)         | 0 a)               | 4                  | 20                 | 100                |
| Number of mated pairs         | 13                 | 13                 | 13                 | 13                 |
| Number of copulated pairs     | 13                 | 12                 | 12                 | 13                 |
| Copulation index              | 100.0              | 92.3               | 92.3               | 100.0              |
| Number of pregnant animals    | 12                 | 10                 | 11                 | 11                 |
| Fertility index               | 92.3               | 83.3               | 91.7               | 84.6               |
| Pairing days until copulation |                    |                    |                    |                    |
| Mean $\pm$ S.D. (N)           | 2.2 $\pm$ 1.1 (13) | 2.5 $\pm$ 1.4 (11) | 2.8 $\pm$ 1.1 (12) | 2.5 $\pm$ 1.1 (13) |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

Copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs)  $\times$  100, %Fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs)  $\times$  100, %

Table 16

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

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

| Compound                                  | TSA             |                 |                 |                 |
|-------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                           | 0 a)            | 4               | 20              | 100             |
| Number of pregnant females                | 12              | 10              | 11              | 11              |
| Number of pregnant females with live pups | 12              | 9               | 11              | 11              |
| Gestation index                           | 100.0           | 90.0            | 100.0           | 100.0           |
| Gestation length in days                  | 22.3 $\pm$ 0.5  | 22.4 $\pm$ 0.5  | 22.5 $\pm$ 0.5  | 22.6 $\pm$ 0.5  |
| Number of corpora lutea                   | 16.4 $\pm$ 1.6  | 14.6 $\pm$ 4.1  | 16.3 $\pm$ 2.7  | 15.5 $\pm$ 1.9  |
| Number of implantation sites              | 15.1 $\pm$ 1.4  | 12.6 $\pm$ 4.9  | 14.4 $\pm$ 0.9  | 14.5 $\pm$ 1.5  |
| Implantation index                        | 92.0 $\pm$ 5.8  | 84.1 $\pm$ 23.0 | 89.6 $\pm$ 9.7  | 93.3 $\pm$ 4.2  |
| Day 0 of lactation                        |                 |                 |                 |                 |
| Number of pups born                       | 13.8 $\pm$ 2.2  | 12.8 $\pm$ 4.5  | 12.5 $\pm$ 2.3  | 12.9 $\pm$ 2.3  |
| Delivery index                            | 91.5 $\pm$ 9.2  | 97.2 $\pm$ 3.3  | 87.3 $\pm$ 14.6 | 90.1 $\pm$ 15.9 |
| Number of live pups                       | 13.8 $\pm$ 2.1  | 12.7 $\pm$ 4.5  | 12.5 $\pm$ 2.3  | 12.7 $\pm$ 2.5  |
| Birth index                               | 91.0 $\pm$ 8.9  | 96.5 $\pm$ 3.4  | 87.3 $\pm$ 14.6 | 88.9 $\pm$ 17.5 |
| Live birth index                          | 99.5 $\pm$ 1.8  | 99.3 $\pm$ 2.2  | 100.0 $\pm$ 0.0 | 98.2 $\pm$ 4.1  |
| Sex ratio on day 0                        | 49.2 $\pm$ 15.1 | 60.2 $\pm$ 22.1 | 41.8 $\pm$ 18.6 | 47.0 $\pm$ 17.8 |
| Day 4 of lactation                        |                 |                 |                 |                 |
| Number of live pups                       | 13.8 $\pm$ 2.1  | 14.0 $\pm$ 2.2  | 12.5 $\pm$ 2.2  | 12.5 $\pm$ 2.6  |
| Viability index                           | 100.0 $\pm$ 0.0 | 100.0 $\pm$ 0.0 | 99.4 $\pm$ 2.1  | 97.8 $\pm$ 5.2  |
| Sex ratio on day 4                        | 49.2 $\pm$ 15.1 | 55.3 $\pm$ 17.5 | 41.3 $\pm$ 18.8 | 47.8 $\pm$ 17.1 |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

Gestation index = (number of pregnant females with live pups / number of pregnant females)  $\times$  100, %Implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea)  $\times$  100, %Delivery index = (number of pups born / number of implantation sites)  $\times$  100, %Birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantation sites)  $\times$  100, %Live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born)  $\times$  100, %Sex ratio on day 0 = (number of male live pups on day 0 / number of live pups on day 0)  $\times$  100, %Viability index = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 0)  $\times$  100, %Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 / number of live pups on day 4)  $\times$  100, %

Table 17

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Body weight of pups up to day 4 of lactation; Mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound              | TSA        |      |            |     |            |      |            |      |
|-----------------------|------------|------|------------|-----|------------|------|------------|------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 a)       |      | 4          |     | 20         |      | 100        |      |
| Day 0 of lactation    |            |      |            |     |            |      |            |      |
| Number of live pups   |            |      |            |     |            |      |            |      |
| Male                  | 6.8 ± 2.3  | (12) | 7.0 ± 3.0  | (9) | 5.2 ± 2.6  | (11) | 6.2 ± 2.9  | (11) |
| Female                | 7.0 ± 2.4  | (12) | 6.4 ± 3.0  | (8) | 7.4 ± 2.9  | (11) | 6.5 ± 2.0  | (11) |
| Weight of pups (g)    |            |      |            |     |            |      |            |      |
| Male                  | 7.0 ± 0.8  |      | 7.1 ± 0.8  |     | 7.1 ± 0.8  |      | 6.9 ± 0.6  |      |
| Female                | 6.7 ± 0.7  |      | 6.6 ± 0.7  |     | 6.6 ± 0.8  |      | 6.5 ± 0.6  |      |
| Day 4 of lactation    |            |      |            |     |            |      |            |      |
| Number of live pups   |            |      |            |     |            |      |            |      |
| Male                  | 6.8 ± 2.3  | (12) | 7.6 ± 2.5  | (8) | 5.1 ± 2.6  | (11) | 6.2 ± 2.9  | (11) |
| Female                | 7.0 ± 2.4  | (12) | 6.4 ± 3.0  | (8) | 7.4 ± 2.9  | (11) | 6.3 ± 1.8  | (11) |
| Weight of pups (g)    |            |      |            |     |            |      |            |      |
| Male                  | 11.0 ± 1.5 |      | 11.0 ± 1.5 |     | 11.4 ± 1.6 |      | 11.0 ± 1.5 |      |
| Female                | 10.7 ± 1.4 |      | 10.6 ± 1.4 |     | 11.1 ± 1.5 |      | 10.5 ± 1.5 |      |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)

Table 18

Preliminary reproduction toxicity screening test of TSA by oral administration in rats

Histopathological findings in individual pups

| Compound<br>Groups (mg/kg) | TSA  |     |
|----------------------------|------|-----|
|                            | 0 a) | 100 |
| No. of dams examined       | 12   | 11  |
| No. of pups examined       | 24   | 84  |
| <u>Abnormalities</u>       |      |     |
| No. of pups                | 0    | 0   |

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na Solution (5 mL/kg)