

食薬セ研第11-1744号

2001年 7月 5日

1, 2, 4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチル
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】

	頁
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条件	3
3. 投与検体の調製	4
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
6. 統計解析	10
結果	11
1. 反復投与毒性	11
1) 一般状態	11
2) 体重	11
3) 摂餌量	11
4) 尿検査	11
5) 血液学検査所見	11
6) 血液生化学検査所見	12
7) 病理学検査所見	12
2. 生殖発生毒性	15
1) 親動物	15
2) 出生児	16
考察	17
Figures (Fig. 1、Fig. 2)	
Tables (Table 1~Table 23)	

【要 約】

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチルの 0 (媒体)、30、125 および 500 mg/kg を Sprague-Dawley 系ラットの雌雄 (各13匹/群) に交配前 2 週間から交配を経て、雄については連続42日間、雌については妊娠期間を通して哺育 4 日まで反復投与して、雌雄動物に対する反復投与毒性ならびに生殖発生毒性について検討した。結果は以下のように要約される。

1. 反復投与毒性

500 mg/kg 投与群の雌 1 例が妊娠23日に死亡した以外に、死亡例は認められなかった。一般状態の変化として、投与直後の流涎が 500 mg/kg 投与群の雌雄に観察された。500 mg/kg 投与群の雌では、妊娠 7～14日の体重増加量が低値を示したが、雄の体重推移および雌雄の摂餌量には被験物質の影響は認められなかった。雌では赤血球数の減少および肝臓重量の増加が 125 mg/kg 投与群で、血中蛋白濃度の減少、ブドウ糖濃度の増加が 500 mg/kg 投与群で認められた。雄では血中蛋白濃度の減少、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が 500 mg/kg 投与群で認められた。病理組織学検査では、小葉中心性の肝細胞肥大が雄の 500 mg/kg 投与群で観察されたが、生殖器系には被験物質の投与に起因したと考えられる異常は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

雌の性周期、雌雄の交尾率、受胎率、さらには母動物の分娩および哺育状態に被験物質の影響を示唆する変化は認められなかった。また、出産率、妊娠期間、妊娠黄体数、着床数および着床率にも被験物質の影響は認められなかった。さらに、出生児の生存性、性比、体重および形態に関しても被験物質に起因する変化は認められなかった。

3. 無作用量

以上の試験結果から、本試験条件下における 1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチルの反復投与毒性に関する無作用量は、雄では 125 mg/kg/day、雌では 30 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無作用量は、親動物および出生児ともに 500 mg/kg/day と判断される。

【緒 言】

OECD 既存化学物質安全性点検等に係わる毒性調査の一環として、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチルの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、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。

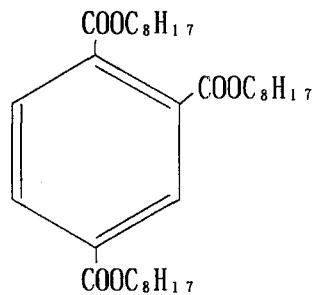
本試験は、「OECD化学物質試験法ガイドライン／反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験法」（1996年3月22日）および、「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として用いた 1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチル（以下 BCTO と略記）の性状は、下記の通りである。

化学名	1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチル
別名	トリメリット酸トリ-n-オクチル
英名	1,2,4-Benzenetricarboxylic acid, trioctyl ester
CAS No.	89-04-3
分子量	546.78
分子式	$C_{33}H_{54}O_6$
物理化学的性質	
性状	淡黄色透明液体
流動点	-50℃
構造式	



試験には、より提供された純度 99 wt%以上（不純物：主に異性体）の BCTO（ロット番号： ）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、容器を密栓し、室温で保管した。使用した被験物質は、において、再度、品質試験を実施し、試験期間中の安定性を確認した（Appendix A）。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、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て使用した。購入した動物は、入荷後 6 日間、検疫と馴化を兼ねて飼育した。検疫期間中は、毎日一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した（注：次頁）。なお、検疫期間中に一般状態の異常を示した動物は認められなかった。検疫終了後は、群分け日までの14日間、性周期および一

般状態を観察した。群分けは、群分け日（投与開始前日）の体重に基づく体重別層化無作為抽出法により行い、各群とも雌雄各13匹を配した。なお、性周期を規則的に回帰しなかった雌、検疫終了後から群分け日までに紅涙がみられた雄1例、および眼球膨大がみられた雌1例は、群分けの対象から除外した。群分け後は、直ちにフェルトペンを用いて尾に個体番号を標識し、群ごと色の異なる動物カードに試験計画番号および個体識別番号を記入して、各飼育ケージに掛けた。なお、出生児については個体識別しなかった。投与開始時の週齢は、雌雄とも10週齢であった。

動物は基準温度22～25℃、基準湿度50～65%、換気回数約15回／時間、照明12時間（7時～19時点灯）に制御された飼育室で、金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に1匹ずつ収容し、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。妊娠18日（交尾確認日＝妊娠0日）以降の雌については、ラット用プラスチック製繁殖ケージ（350w×400d×180h mm）に収容し、床敷として紙パルプ製チップ（ALPHA-dri、加商株式会社）を供給した。なお、飼育期間中、飼育室の温度は22.5～24.0℃、湿度は51.5～66.0%の範囲内にあり、湿度は一時的に基準値（前述）から外れたが、逸脱した時間は30分以内であったことから、試験成績への影響はないと判断した。供給した飼料、飲料水および床敷には試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

3. 投与検体の調製

媒体は、被験物質が水に溶けにくい [0.1%以下 (25℃)] ため、コーン油を選択した。投与検体は、供給された被験物質を各濃度ごとに秤量し、所定の濃度となるようにコーン油（ナカライテスク株式会社、製造番号：V9F1299）に溶解して調製した。先に実施した「BCTO のラットを用いる単回投与毒性試験（試験計画番号：A-99-059）」において、1および25% (w/v) の調製検体について、冷蔵、遮光条件下での8日間の安定性が確

（注）	動物入荷日	: 2000年4月12日
	入荷動物数	: 雄62匹、雌73匹
	入荷時体重範囲	: 雄 235.5～258.6 g、雌 170.0～201.2 g ^{a)}
	検疫終了時体重範囲	: 雄 282.5～319.2 g、雌 191.2～242.5 g
	投与開始日	: 2000年5月2日
	投与開始時体重範囲	: 雄 377.1～433.0 g、雌 225.2～283.8 g

^{a)} 雌の体重幅は、試験計画書に記載の「30 g 以内」から逸脱したが、輸送による変動で、試験への影響はないと判断した。

認されていることから（Appendix B）、調製した検体は、冷蔵、遮光下で気密容器に入れて保管し、調製後 8 日以内に投与した。各濃度の投与検体については、秦野研究所において被験物質の含量を測定し、規定範囲内にあることを確認した（Appendix C）。調製検体中の被験物質濃度の測定条件については、Appendix D に概略を示した。なお、投与検体は溶液であることから、均一性試験は実施しなかった。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

投与量は、反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合予備試験（試験計画番号：R-99-009）の結果に基づいて決定した。すなわち、500 および 1000 mg/kg の BCTO を各群 5 匹の雌雄ラットに14日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg 投与群において体重の増加抑制が認められ、同群の雌においては投与後に一過性の流涎が観察された。また、雄では 500 mg/kg 以上の投与群において肝臓重量の増加が認められ、1000 mg/kg 投与群の肝臓には淡色領域が観察された。雌の 500 mg/kg 以上および雄の 1000 mg/kg 投与群では前胃粘膜の浮腫が認められた。以上の結果と本試験での投与期間を考慮し、死亡を発現せず、明らかな毒性徴候を示すと判断された 500 mg/kg を高用量とし、以下公比約 4 で減じて 125 および 30 mg/kg を中および低用量に設定した。なお、対照群にはコーン油を被験物質投与群と同一条件で投与した。

以下に群構成を示す。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	匹数（動物番号）	
			雄	雌
1	媒体（コーン油）	0	13 (MX01001～MX01013)	13 (FB01001～FB01013)
2	BCTO	30	13 (MX02001～MX02013)	13 (FB02001～FB02013)
3	BCTO	125	13 (MX03001～MX03013)	13 (FB03001～FB03013)
4	BCTO	500	13 (MX04001～MX04013)	13 (FB04001～FB04013)

投与期間は、雄に対しては交配前 2 週間から交配を経て、剖検前日までの連続42日間、また、雌に対しては交配前 2 週間から交配を経て、妊娠期間を通して哺育 4 日（分娩日＝哺育 0 日）まで、分娩しなかった雌は妊娠25日相当日まで、毎日 1 回、ラット用胃管を用いて強制経口投与した。なお、毎日の投与は 9 時～12 時の間に行い、各動物に投与する液量（体重 1 kg 当たり 2 mL）は、最近時の体重を基に算出した。

5. 観察方法

1) 親動物

①一般状態の観察

全例について、毎日1回以上、投与期間中は投与前後の毎日2回以上観察した。

②体重測定

雄は投与1（投与開始日）、7、14、21、28、35、42日および解剖日に、雌は投与1、7、14日および妊娠0、7、14、20日に、分娩例は哺育0、4日および解剖日に体重を測定した。なお、未分娩例は妊娠26日相当日に、また死亡例は発見時に体重を測定した。

③摂餌量測定

雄は投与1～2、7～8、14～15、29～30、35～36および41～42日に、雌は投与1～2、7～8、14～15日および妊娠0～1、7～8、14～15、20～21日に、分娩例は哺育3～4日にそれぞれ給餌量および残餌量を測定し、その差から摂餌量を算出した。

④性周期

全ての雌について、群分け日までの性周期観察に引き続き、膣スメアを毎日採取し、同居後、交尾が確認されるまで性周期を観察した。性周期は4日周期（4日間隔で発情を回帰）および不正周期（4または5日以外の間隔で発情を回帰）に分類し、投与開始後に性周期が変化した動物の頻度および平均発情回帰日数（発情期から次回発情期までの平均日数）を群ごとに算出した。

⑤交配

交配は投与15日（雌雄とも12週齢）の夕方から、同群内の雌雄を1対1で連日同居させて行った。交尾の確認は、膣栓の存在あるいは膣スメア中の精子の有無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。交配の結果から、交尾率 $[(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100]$ 、受胎率 $[(\text{妊娠動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100]$ 、同居開始日から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

⑥分娩および哺育状態の観察

交尾を確認した雌は全例を自然分娩させた。分娩の確認は妊娠21日から毎日行い、午前11時までに分娩が終了した例については、その日を分娩日と規定し、妊娠0日から分娩日までの日数（妊娠期間）を算出した。なお、午前11時を過ぎてから分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。分娩状態が直接観察できた動物についてはその状態を断続的に観察し、直接観察できなかった動物についても、分娩前後の一般状態および産児の状態から分娩困難や遅延などの分娩障害の有無を判断して記録した。哺育例については、哺育1～4日の哺育状態（哺育児の一般状態を含む）を毎日観察した。

⑦尿検査

投与5週に、各群とも動物番号の若い順から雌雄各5例を選び、代謝ケージに4時間收容し、尿を採取して以下の項目について検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
色調・混濁度 pH・潜血・蛋白・糖・ケトン体 ウロビリノーゲン・ビリルビン	視 診 試験紙法 同 上	クリニック 200+ (パイエル・三共) 同 上

⑧血液学検査

雄は投与42日の翌日に、分娩した雌は哺育4日の翌日に、交尾をしたが分娩しなかった雌は妊娠26日相当日に、それぞれ前日より18～24時間絶食させた後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈より抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて採血し、以下に示す項目のうちプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間を測定した。次いで、腹部後大静脈より抗凝固剤として EDTA-3K を用いて採血し、以下に示すその他の項目について検査した。なお、血液自動分析装置による白血球分類の補助として、静脈血塗抹標本（Wright-Giemsa 染色）を作製し、必要に応じて光学顕微鏡にて視算を行った。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
プロトロンビン 時間 (PT)	光散乱検出法	全自動血液凝固測定装置 CA-1000 (東亜医用電子)
活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	同上	同上
赤血球数 (RBC)	自動 (電気抵抗法)	血液自動分析装置 CELL-DYN3500SL (ダイネボット)

項 目	測 定 法	使 用 機 器
白血球数 (WBC)	自動 (フローサイトメトリ・レーザ光散乱法/ 電気抵抗法)	血液自動分析装置 CELL-DYN3500SL (ダイボット)
白血球分類	自動 (フローサイトメトリ・レーザ光散乱法)	同上
血色素量 (Hb)	自動 (吸光度法)	同上
平均赤血球容積 (MCV)	自動 (電気抵抗法)	同上
血小板数	自動 (電気抵抗法)	同上
ヘマトクリット 値 (Ht)	計算 ($RBC \times MCV \times 0.001$)	
平均赤血球血色素量 (MCH)	計算 ($Hb \times 1000 / RBC$)	
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	計算 ($Hb \times 100 / Ht$)	
網状赤血球比率	Brecher 法	光学顕微鏡

⑨血液生化学検査

血液学検査のための採血に引き続き、腹部後大静脈より抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、血漿を分離して以下の項目について検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
総蛋白濃度	ビュレット 法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS- FARA (ロシュ)
アルブミン 濃度	BCG 法	同上
総コレステロール 濃度	COD・DAOS法	同上
ブドウ糖濃度	グルコナーゼ G6PDH 法	同上
尿素窒素濃度 (BUN)	ウレアーゼ G.DH 法	同上
クレアチニン濃度	Jaffé 法	同上
アルカリフォスファターゼ活性 (ALP)	GSCC 法	同上
GOT (AST) 活性	IFCC 法	同上
GPT (ALT) 活性	同上	同上
γ-GTP活性	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法	同上
トリグリセリド濃度	GPO・DAOS法	同上
無機リン濃度 (Inorg. phos.)	モリブデン 酸直接法	同上
総ビリルビン 濃度	Jendrassik/Grof 法	同上
カルシウム 濃度	OCPC法	同上
A/G比	計算	
ナトリウム 濃度	イオン 電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)
カリウム濃度	同上	同上
塩素濃度	同上	同上

⑩病理学検査

生存例は採血後に、死亡例は発見後に、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行った。その際、生存例については脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量を測定し、併せて比体重値（相対重量）を算出した。雌では卵巣および子宮を摘出し、卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮は着床数をそれぞれ数え、着床率〔(着床数／妊娠黄体数)×100〕を算出した。その際、子宮に着床痕が確認されなかった動

物を不妊例とした。全例の脳、下垂体、脊髄、甲状腺、心臓、気管、気管支、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨骨髓、雄の前立腺腹葉ならびに精嚢（凝固腺を含む）、雌の卵巣、子宮ならびに腔、および病変部は、0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン液に固定して保存した。その際、肺は注入固定を行った。雄の精巣および精巣上体はブアン液に固定後、長期保存のために0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン液に置換した。

卵巣、精巣および精巣上体は全例について標本を作製し、病理組織検査を実施した。肝臓については、雄は全例、雌は対照群および500 mg/kg 投与群の全例、胃については、雌は全例、雄は対照群および500 mg/kg 投与群の全例について病理組織検査を実施した。その他の保存器官については、対照群および500 mg/kg 投与群の動物番号の若い順から、雄は各5例について、雌は不妊例を除く各6例（切出し時に下垂体、脊髄、胸腺の損失があり1例追加した）について病理組織検査を実施した。なお、剖検時に異常が認められた125 mg/kg 投与群の雌1例については脾臓、肝臓、腸間膜リンパ節および大腿骨骨髓の病理組織検査を、対照群の雄1例については回腸の病変部の病理組織検査をそれぞれ追加して実施した。その他、脱毛が観察された皮膚を病変部として保存したが、被験物質の影響を示唆する変化ではないと判断し、病理組織学検査は実施しなかった。

2) 出生児

①産児数および形態

哺育0日に産児の性別および外表奇形の有無を観察した後、生存児数および死亡児数を雌雄別に数え、分娩率 $[(\text{産児数} / \text{着床痕数}) \times 100]$ 、生児出産率 $[(\text{出產生児数} / \text{着床痕数}) \times 100]$ 、出生率 $[(\text{出產生児数} / \text{産児数}) \times 100]$ および性比 $[(\text{雄生児数} / \text{全生児数}) \times 100]$ を求めた。

②哺育児数

哺育1～4日に生児数と死亡児数を雌雄別に毎日調べ、哺育4日の新生児生存率 $[(\text{哺育4日の生児数} / \text{哺育0日の生児数}) \times 100]$ および性比 $[(\text{雄生児数} / \text{全生児数}) \times 100]$ を求めた。死亡児は、発見後速やかに剖検し、0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン液に固定して保存した。

③体重測定

哺育0日および4日に個別に体重を測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出した。

④剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させ剖検した。

6. 統計解析

性周期の変化した動物の頻度、交尾率ならびに受胎率については Fisher の直接確率検定を行った。被験物質投与群の病理組織学検査所見のうち、グレード分けしたデータは Mann-Whitney のU検定により、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の間で有意差検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を1標本として、先ず Bartlett の方法により各群の分散の一意性について検定を行い、分散が一意である場合には、一元配置型の分散分析を実施し、群間に有意性が認められた場合は、Dunnett 法により多重比較を行った。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意でない場合には、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。有意水準はいずれも5%とした。

【結 果】

1. 反復投与毒性

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

500 mg/kg 投与群の雌1例(動物番号:FB04009)は、投与42日(妊娠23日)の投与後に死亡した。死亡した動物は、投与直後の流涎(後述)が投与14日から断続的にみられた他、死亡日の投与前には紅涙および眼周囲褐色汚染が観察された。

生存例では、投与直後の流涎が 500 mg/kg 投与群の雄11例および雌4例に観察された。流涎は、最も早い動物で投与9日から断続的にみられ、いずれも投与の2~3時間後には消失する一過性の変化であった。その他、脱毛が各投与群の雌雄合わせて2~5例に、消瘦、軟便および外陰部周囲汚染が対照群の雌1例に観察された。

2) 体重 (Figs. 1、2; Tables 3~6; Appendices 3-1~6-4)

雄では、体重の実測値 (Table 3) および増加量 (Table 4) について、対照群と BCT0 各投与群との間に有意差は認められなかった。雌では、体重の実測値 (Table 5) に有意差は認められなかったが、500 mg/kg 投与群における妊娠7~14日の増加量が、対照群と比較して有意な低値を示した (Table 6)。

3) 摂餌量 (Tables 7、8; Appendices 7-1~8-4)

摂餌量は、雌雄、いずれの時期においても、対照群と BCT0 各投与群との間に有意差は認められなかった。

4) 尿検査 (Table 9; Appendices 9-1~9-2)

尿のpHが高値を示した動物が、500 mg/kg 投与群の雄で多くみられたが、その他の検査項目については、被験物質の影響を示唆する変化は認められなかった。

5) 血液学検査所見 (Tables 10、11; Appendices 10-1~11-4)

雄では、いずれの検査項目についても、対照群と BCT0 各投与群との間に有意差は認められなかった。雌では、赤血球数の有意な減少が 125 mg/kg 以上の投与群で、また、白血球数の有意な減少が 500 mg/kg 投与群で認められた。その他、血色素量およびヘ

マトクリット値の有意な減少が 125 mg/kg 投与群において、白血球分類における好中球の有意な減少が 30 mg/kg 投与群でみられたが、被験物質の用量に依存した変化ではなかった。

6) 血液生化学検査所見 (Tables 12、13 ; Appendices 12-1~13-4)

総蛋白濃度の有意な減少が 500 mg/kg 投与群の雌雄で認められ、さらに同群の雄では、アルカリフォスファターゼ活性の有意な上昇、雌ではクレアチニン濃度の有意な減少、さらにブドウ糖濃度の有意な増加が認められた。その他、 γ -GTP 活性の有意な低下が 30 mg/kg 投与群の雄にみられたが、用量に依存した変化ではなかった。

7) 病理学検査所見

①雄

a) 剖検所見 (Table 14 ; Appendix 14)

生殖器の異常としては、精巣の小型化および水腫が 125 mg/kg 投与群の 1 例に、精巣上体の結節が 500 mg/kg 投与群の 1 例に、いずれも片側性に観察された。生殖器以外の異常としては、脾臓の腫大、あるいは前胃粘膜の肥厚および白濁が 500 mg/kg 投与群の各 1 例に、回腸の漿膜側に隆起部が対照群の 1 例に観察されたが、被験物質の影響を示唆する変化は認められなかった。

b) 器官重量 (Table 15 ; Appendices 15-1~15-4)

精巣重量の有意な低下が 125 mg/kg 投与群に認められたが、用量に依存した変化ではなく、その他の器官についても、対照群と BCTO 各投与群との間に有意差は認められなかった。

c) 病理組織学検査所見 (Table 16 ; Appendix 16)

精巣では、両側性の精細管萎縮が対照群および 30 mg/kg 投与群の各 1 例に、片側性の精細管萎縮が 125 mg/kg 投与群の 2 例および 500 mg/kg 投与群の 1 例に観察された。精巣上体では、精細管萎縮の程度が強かった例に精巣上体管内の精子減少や細胞残屑が観察され、さらに精子肉芽腫が 500 mg/kg 投与群の 1 例に、間質へのリンパ球浸潤が各投与群の 1~2 例に認められたが、その他の動物に異常は認められず、用量に依存した変化

はなかった。

肝臓では、小葉中心性の肝細胞肥大が 500 mg/kg 投与群の 5 例に認められたが、いずれも軽度な変化であった。また、門脈周囲性の脂肪化が各群とも全例にみられたが、500 mg/kg 投与群における脂肪化の程度は、対照群に比較すると有意に軽減した。その他、ごく軽度の小肉芽腫が各群の 4 ～ 5 例に観察された。

腎臓では、好酸性小体および皮質に好塩基性尿細管が、組織検査を実施した対照群および 500 mg/kg 投与群で観察されたが、両群間に程度および頻度の差はなかった。その他、皮髄境界部に円柱が対照群の 1 例で観察された。

脾臓では、髄外造血および褐色色素の沈着が、対照群および 500 mg/kg 投与群の全例に観察されたが、両群間に程度の差はなかった。

前立腺では、間質あるいは上皮にリンパ球および形質細胞の浸潤が、対照群および 500 mg/kg 投与群で観察されたが、両群間に程度および頻度の差はなかった。

肺では、泡沫細胞の集簇が、対照群および 500 mg/kg 投与群に観察されたが、両群間に程度および頻度の差は認められなかった。その他、動脈に鈣質沈着が 500 mg/kg 投与群の 1 例で観察された。

上記以外の器官では、心筋の変性および線維化が対照群の 1 例に、膀胱の粘膜固有層にリンパ球浸潤が対照群の 2 例に、回腸に憩室が対照群の 1 例に観察された。

②雌

a) 剖検所見 (Table 17; Appendix 17)

妊娠23日に死亡した 500 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：FB04009）には、腎臓の暗色化、脾臓の淡色化を伴う小型化、肝臓の淡色化を伴う腫大、胸腺の小型化、副腎の腫大がみられた他、前胃および腺胃粘膜の黄色化、被毛の汚れが観察された。

生存例では、腺胃粘膜の黒色あるいは暗赤色点、30 mg/kg 投与群の 1 例および 500 mg/kg 投与群の 2 例に観察された。また、125 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：FB03012）では、腫大した脾臓に黄白色域がみられ、腎臓、卵巣、胃および脂肪組織と癒着していたほか、肝臓、腸間膜リンパ節の腫大および骨髄の淡色化が観察された。その他、胸腺の小型化が対照群の 2 例および 125 mg/kg 投与群の 1 例に観察され、このうち対照群の 2 例には、脾臓の小型化、腎臓の淡色化、肝臓の淡色化などが観察された。

b) 器官重量 (Table 18 ; Appendices 18-1~18-4)

肝臓重量の有意な増加が 125 mg/kg 以上の投与群で認められ、500 mg/kg 投与群では、肝臓の相対重量も有意に増加した。その他、BCTO 各投与群で心臓の相対重量が対照群より有意に低下したが、絶対重量には有意な変化は認められなかった。

c) 病理組織学検査所見 (Table 19 ; Appendix 19)

死亡例（動物番号：FB04009）では、腎臓の皮質に近位尿細管の壊死および空胞変性、遠位尿細管に細胞残屑を伴った管腔の拡張が認められたほか、近位尿細管に好酸性色素の沈着、皮質および髄質に好酸性の円柱が多数観察された。なお、好酸性の色素および円柱は、Benzidine reaction に陽性で、PAS 染色に陰性であったことから、ヘモグロビンであると判断した。同例の脾臓には、髄外造血および褐色色素の沈着がみられたが、白脾髄および赤脾髄は萎縮していた。その他、胸腺の萎縮、前胃粘膜のびらん、副腎の束状帯における脂肪滴の増加、肝臓に門脈周囲性の脂肪化が観察された。

生存例の胃では、前胃の扁平上皮細胞の過形成が、対照群の 3 例、30 mg/kg 投与群の 4 例、125 mg/kg 投与群の 2 例および 500 mg/kg 投与群の 5 例に観察されたが、いずれの例も程度はごく軽度であった。その他、前胃粘膜の潰瘍が 30 mg/kg 投与群に、びらんが 500 mg/kg 投与群に各 1 例みられた。

脾臓では、剖検時に脾臓の腫大が観察された動物（動物番号：FB03012）に、髄外造血および褐色色素の沈着に加え、好中球およびマクロファージの浸潤と線維芽細胞の増殖を伴う限局性の壊死巣が多数認められた。また、同例の肝臓には、類洞に腫大したクッパー細胞の増殖、好中球およびリンパ球の浸潤、胆管の増生、小肉芽腫が認められた他、腸間膜リンパ節には類洞のマクロファージと髄索の形質細胞の増生が、大腿骨の骨髓には顆粒球系細胞の造血亢進が観察された。対照群および 500 mg/kg 投与群の全例においても髄外造血および褐色色素の沈着はみられたが、両群間に程度の差はなかった。その他、赤脾髄の萎縮が対照群の 2 例に観察された。

肝臓では、門脈周囲性の脂肪化が対照群および 500 mg/kg 投与群の全例にみられたが、両群間に程度の差は認められなかった。その他、ごく軽度の小肉芽腫が両群の 2~3 例に観察された。

腎臓では、皮質に好塩基性尿細管が対照群および 500 mg/kg 投与群で観察されたが、両群間に程度および頻度の差はなかった。500 mg/kg 投与群では、さらに、近位尿細

管の空胞変性が1例に、鉍質沈着が2例に観察されたが、いずれもごく軽度な変化であった。その他、対照群の2例には、近位尿細管の壊死および空胞変性、遠位尿細管の拡張が観察された。

胸腺では、萎縮が対照群の1例および500 mg/kg 投与群の2例に認められた他、剖検時に胸腺の小型化が観察された125 mg/kg 投与群の1例でも萎縮が確認された。

肺では、泡沫細胞の集簇が対照群および500 mg/kg 投与群にみられたが、両群間の程度および頻度に差は認められなかった。その他、動脈に鉍質沈着が対照群の1例で観察された。

上記以外の器官については、卵巣を含む検査対象器官に異常は観察されなかった。なお、不妊例（動物番号：FB01002）には、肝臓に門脈周囲性の脂肪化および小肉芽腫がごく軽度に見られたが、その他の器官に異常はなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物

①性周期 (Table 20 ; Appendices 20-1~20-4)

発情回帰の型および平均発情回帰日数に、被験物質の影響は認められなかった。

②交配成績 (Table 21 ; Appendices 21-1~21-4)

全例で交尾が確認され、同居から交尾までに要した日数についても対照群と BCT0 各投与群との間に有意差は認められなかった。また、受胎率、同居開始日から交尾までの日数、およびその間に回帰した発情期の回数 (Table 20) にも、対照群と BCT0 各投与群との間に有意差は認められなかった。

③分娩および哺育状態

500 mg/kg 投与群の1例（動物番号：FB04009）が妊娠23日に死亡したが、その他の動物には、分娩状態の異常は観察されなかった。哺育状態については、哺育3~4日に哺育児の削瘦が対照群の2例（動物番号：FB01004、FB01005）で観察されたが、その他の動物には、哺育状態の異常は観察されなかった。

④出産率および妊娠期間 (Table 22 ; Appendices 22-1~22-4)

500 mg/kg 投与群の1例が妊娠中に死亡したため、同群の出産率は 92.3%であったが、その他の群では出産率は 100%であった。妊娠期間については、対照群と BCT0 各投与群との間に有意差は認められなかった。

⑤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は、対照群と BCT0 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 出生児

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、哺育4日の生児数および新生児生存率のほか、哺育0および4日の性比には、対照群と BCT0 各投与群との間に有意差は認められなかった。

②体重 (Table 23 ; Appendices 23-1~23-4)

哺育0および4日における雌雄別の哺育児体重には、対照群と BCT0 各投与群との間に有意差は認められなかった。

③形態

哺育0日における生存児の外表観察、哺育4日までに死亡した児の剖検、さらには哺育4日における生存児の剖検では、異常は認められなかった。

【考 察】

1. 反復投与毒性

500 mg/kg 投与群の雌1例が妊娠23日に死亡した。剖検の結果、子宮内に胎児が認められ、腎臓の病理組織学検査では近位尿細管の壊死および空胞変性、遠位尿細管の拡張が観察されたが、壊死の程度は軽度であったことから、腎病変が死因につながる可能性は低いと考えられた。同群ではその他の動物に同様の組織所見および分娩状態の異常は観察されず、対照群においても2例に近位尿細管の壊死および空胞変性、さらには遠位尿細管の拡張が観察されていることから、500 mg/kg 投与群の死亡例は被験物質の毒性を強く示唆するものではないと考えられる。

生存例においては、500 mg/kg 投与群の雌雄で投与後の一過性の流涎が観察され、同群の雌では妊娠期間中に体重増加抑制がみられた。また、125 mg/kg 以上の投与群の雌で肝臓重量の増加が認められた。本試験に先立ち実施した予備試験においても、同様の変化がみられていることから、一過性の流涎、体重増加抑制および肝臓重量の増加は、被験物質の投与に起因した変化と考えられる。

血液学検査においては、赤血球数の減少が125 mg/kg 以上の投与群の雌で認められたが、網状赤血球比率、脾臓および骨髄の組織学検査で造血機能低下あるいは血球破壊亢進を示唆する変化は認められなかったことから、軽度の貧血と考えられる。なお、500 mg/kg 投与群の死亡例においては、組織学的検査でヘモグロビン尿が観察されていることから溶血に起因した変化が疑われるが、血液学検査でみられた赤血球数の減少との関係は明らかではなかった。その他、白血球数の減少が500 mg/kg 投与群の雌でみられたが、白血球百分比および骨髄の組織学検査では異常は認められず、軽微な変化であった。

尿検査では、500 mg/kg 投与群の雄でpHが高値を示した例が多くみられたが、同群の雌には同様の傾向は認められず、泌尿器系の病理組織学検査にも異常は観察されなかった。

病理組織学検査の結果、500 mg/kg 投与群の雄で小葉中心性の肝細胞肥大が観察され、同群では門脈周囲性の脂肪化が軽減したが、肝細胞の障害を示唆する変化ではなかった。肝臓重量の増加が認められた雌では同様の所見は認められていないが、血液生化学検査においても、500 mg/kg 投与群の雌雄で総蛋白濃度の減少、雄でアルカリフォスファターゼ活性の上昇、雌でブドウ糖濃度の増加が認められ、被験物質の肝臓に対する影響が示唆されたが、毒性としては軽度なものと考えられる。なお、500 mg/kg 投与群の雌でみられた

クレアチニン濃度の変化は、増加ではないことから毒性学的意義のない変化と判断した。

2. 生殖発生毒性

雌の性周期、雌雄の交尾率、受胎率に被験物質の影響は認められず、母動物の出産率、妊娠期間、分娩状態、哺育状態、妊娠黄体数、着床数および着床率にも被験物質の投与に起因したと考えられる変化は観察されなかった。また、生殖器系の病理組織学検査においても、被験物質の影響を示唆する所見は観察されなかった。出生児についても、生存性、性比、体重および形態に被験物質投与の影響は認められなかった。

3. 無作用量

以上の結果から、本試験では反復投与毒性として、125 mg/kg 以上の投与群の雌で肝臓重量の増加および軽度の貧血が認められ、500 mg/kg 投与群では雌雄で一過性の流涎、雌で体重増加抑制、雄で小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。生殖発生毒性としては親動物および出生児に被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。したがって、本試験条件下における反復投与毒性に関する無作用量は雄が 125 mg/kg/day、雌が 30 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無作用量は親動物および出生児ともに 500 mg/kg/day と考えられる。

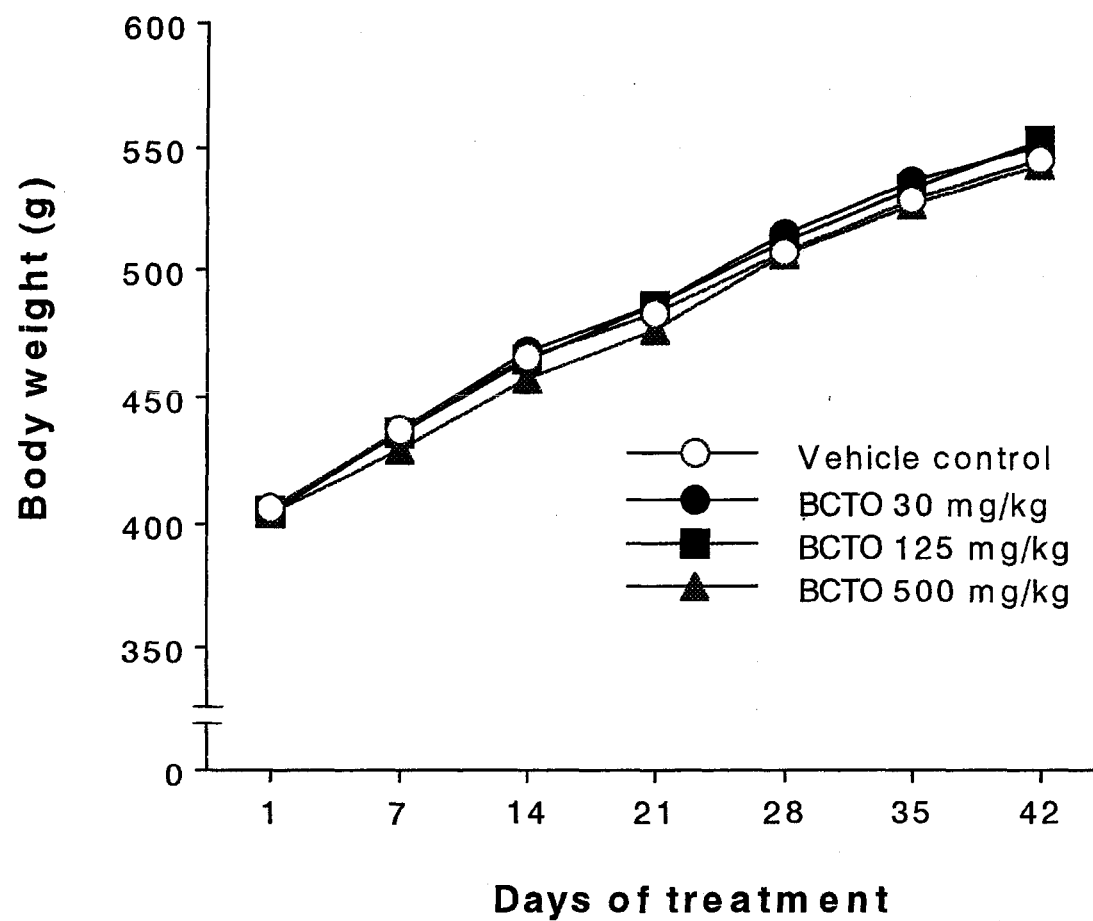


Fig. 1 Body weight of males

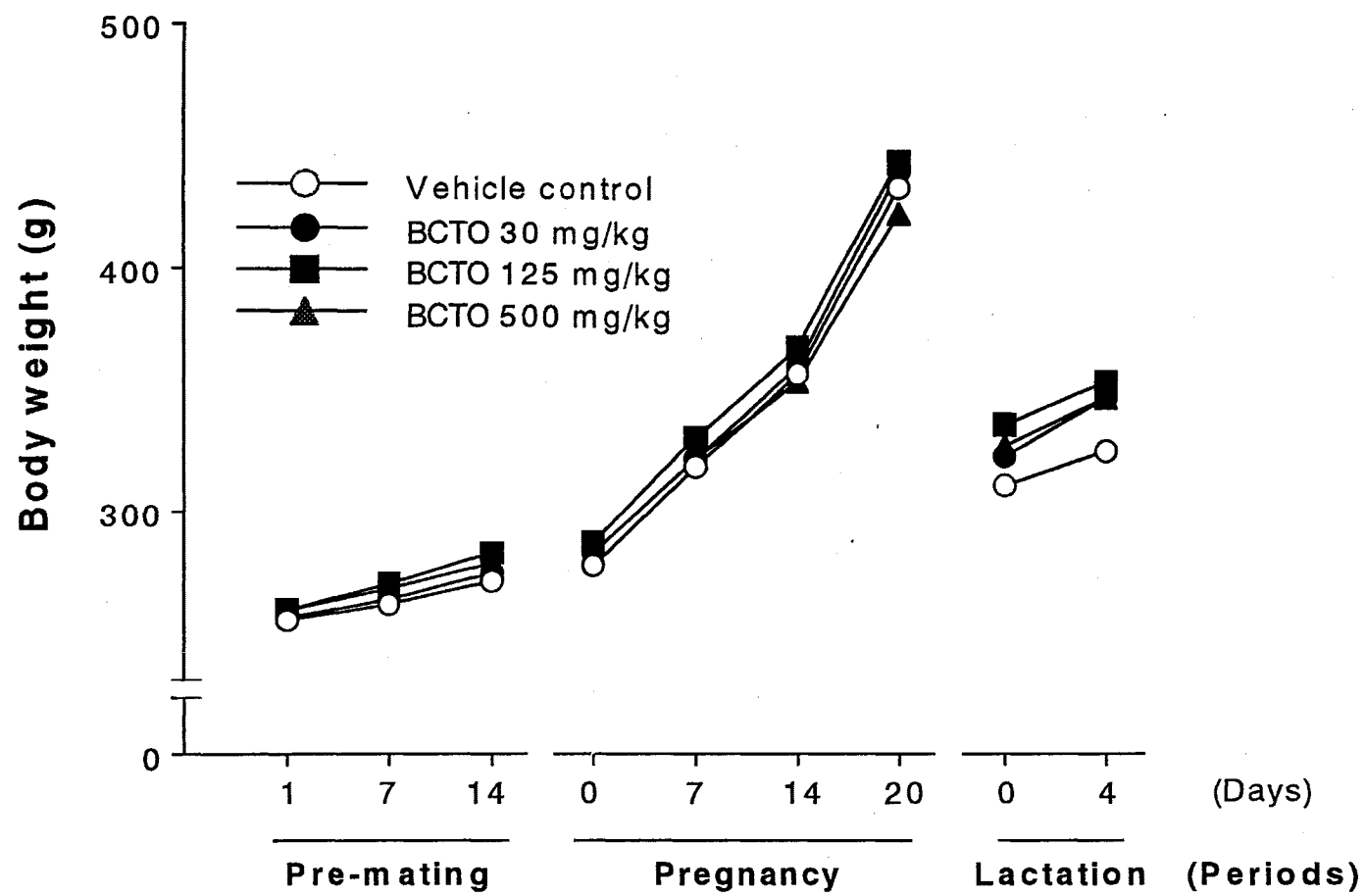


Fig. 2 Body weight of females

【TABLE INDEX】

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

Table no.	(Appendix no.)	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	(9-1~9-2)	Urinalysis values in animals
10	(10-1~10-4)	Hematological findings in males
11	(11-1~11-4)	Hematological findings in females
12	(12-1~12-4)	Biochemical findings in males
13	(13-1~13-4)	Biochemical findings in females
14	(14)	Macroscopic findings in males
15	(15-1~15-4)	Organ weight of males
16	(16-1~16-2)	Histological findings in males
17	(17)	Macroscopic findings in females
18	(18-1~18-4)	Organ weight of females
19	(19-1~19-2)	Histological findings in females
20	(20-1~20-4)	Estrous cycles
21	(21-1~21-4)	Reproductive performance
22	(22-1~22-4)	Development of pups up to day 4 of lactation
23	(23-1~23-4)	Body weight of pups up to day 4 of lactation

Table 1

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

Clinical signs of males

Compound	BCTO			
	0 ^{a)}	30	125	500
No. of males examined	13	13	13	13
No. of males with abnormality	1	2	2	11
Category of abnormality; N				
Salivation	0	0	0	11
Loss of fur	1	2	2	0

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

Table 2

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

Clinical signs of females

Compound	BCTO			
	0 ^{a)}	30	125	500
No. of females examined	13	13	13	13
No. of dead females	0	0	0	1
No. of females with abnormality	3	1	3	5
Category of abnormality; N				
Salivation	0	0	0	5
Loss of fur	2	1	3	2
Emaciation	1	0	0	0
Loose stool	1	0	0	0
Soiled perineal region	1	0	0	0
Soiled fur around eyelid	0	0	0	1
Reddish tear	0	0	0	1

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

Table 3

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

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

Compound		BCTO							
Groups (mg/kg)		0 ^{a)}		30		125		500	
Days of treatment									
1 (initial body weight)		406.3 $\pm$ 14.4	(13)	403.7 $\pm$ 15.9	(13)	405.4 $\pm$ 15.0	(13)	403.8 $\pm$ 13.7	(13)
7		436.2 $\pm$ 16.7	(13)	436.9 $\pm$ 21.2	(13)	435.9 $\pm$ 16.6	(13)	429.2 $\pm$ 14.4	(13)
14		465.7 $\pm$ 23.0	(13)	468.2 $\pm$ 28.5	(13)	464.1 $\pm$ 23.0	(13)	456.6 $\pm$ 17.9	(13)
21		482.7 $\pm$ 27.2	(13)	486.5 $\pm$ 31.5	(13)	486.2 $\pm$ 23.4	(13)	477.0 $\pm$ 22.0	(13)
28		508.2 $\pm$ 33.4	(13)	515.6 $\pm$ 36.5	(13)	512.2 $\pm$ 26.7	(13)	506.7 $\pm$ 24.6	(13)
35		530.1 $\pm$ 37.0	(13)	537.4 $\pm$ 43.8	(13)	533.6 $\pm$ 29.1	(13)	527.1 $\pm$ 24.7	(13)
42		546.3 $\pm$ 42.8	(13)	551.6 $\pm$ 53.6	(13)	553.4 $\pm$ 31.6	(13)	543.4 $\pm$ 24.3	(13)

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

Table 4

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

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

Compound	BCTO							
Groups (mg/kg)	0 ^{a)}		30		125		500	
Days of treatment								
1-7	29.9 $\pm$ 7.0	(13)	33.2 $\pm$ 6.5	(13)	30.5 $\pm$ 5.2	(13)	25.4 $\pm$ 4.8	(13)
7-14	29.5 $\pm$ 8.1	(13)	31.2 $\pm$ 9.2	(13)	28.2 $\pm$ 8.1	(13)	27.4 $\pm$ 5.4	(13)
14-21	17.0 $\pm$ 9.3	(13)	18.3 $\pm$ 11.2	(13)	22.1 $\pm$ 6.0	(13)	20.4 $\pm$ 6.0	(13)
21-28	25.5 $\pm$ 8.9	(13)	29.1 $\pm$ 8.4	(13)	26.0 $\pm$ 6.7	(13)	29.7 $\pm$ 6.5	(13)
28-35	22.0 $\pm$ 6.7	(13)	21.8 $\pm$ 9.8	(13)	21.5 $\pm$ 5.0	(13)	20.4 $\pm$ 5.6	(13)
35-42	16.2 $\pm$ 8.9	(13)	14.2 $\pm$ 11.1	(13)	19.7 $\pm$ 3.2	(13)	16.3 $\pm$ 6.2	(13)

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

Table 5

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

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

Compound		BCTO							
Groups (mg/kg)	0 ^{a)}		30		125		500		
Days of treatment									
1	254.7 $\pm$ 10.3	(13)	255.6 $\pm$ 15.3	(13)	259.6 $\pm$ 17.5	(13)	259.0 $\pm$ 14.2	(13)	
7	261.6 $\pm$ 18.6	(13)	263.7 $\pm$ 15.9	(13)	269.8 $\pm$ 18.2	(13)	267.5 $\pm$ 14.2	(13)	
14	271.3 $\pm$ 20.8	(13)	274.2 $\pm$ 19.3	(13)	283.4 $\pm$ 22.5	(13)	278.7 $\pm$ 17.3	(13)	
Days of pregnancy									
0	278.0 $\pm$ 22.2	(12)	283.1 $\pm$ 17.7	(13)	287.6 $\pm$ 19.6	(13)	283.0 $\pm$ 16.2	(13)	
7	318.2 $\pm$ 17.3	(12)	321.5 $\pm$ 18.0	(13)	330.9 $\pm$ 21.5	(13)	321.8 $\pm$ 17.4	(13)	
14	356.8 $\pm$ 18.3	(12)	359.4 $\pm$ 17.3	(13)	367.8 $\pm$ 25.2	(13)	353.1 $\pm$ 22.1	(13)	
20	432.9 $\pm$ 22.4	(12)	439.1 $\pm$ 20.4	(13)	443.4 $\pm$ 28.4	(13)	422.6 $\pm$ 28.5	(13)	
Days of lactation									
0	311.4 $\pm$ 25.9	(12)	322.7 $\pm$ 27.3	(13)	335.6 $\pm$ 28.9	(13)	327.4 $\pm$ 23.4	(12)	
4	325.7 $\pm$ 39.6	(12)	346.4 $\pm$ 18.4	(13)	352.8 $\pm$ 25.8	(13)	346.4 $\pm$ 17.5	(12)	

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

Table 6

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

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

Compound	BCTO							
Groups (mg/kg)	0 ^{a)}		30		125		500	
Days of treatment								
1-7	6.9 $\pm$ 11.0	(13)	8.1 $\pm$ 7.4	(13)	10.2 $\pm$ 10.5	(13)	8.5 $\pm$ 8.2	(13)
7-14	9.7 $\pm$ 7.2	(13)	10.5 $\pm$ 6.1	(13)	13.5 $\pm$ 7.6	(13)	11.3 $\pm$ 7.9	(13)
Days of pregnancy								
0-7	40.2 $\pm$ 7.2	(12)	38.5 $\pm$ 4.7	(13)	43.3 $\pm$ 6.8	(13)	38.8 $\pm$ 7.5	(13)
7-14	38.6 $\pm$ 5.3	(12)	37.9 $\pm$ 5.2	(13)	36.9 $\pm$ 8.2	(13)	31.3 $\pm$ 7.7 *	(13)
14-20	76.1 $\pm$ 9.6	(12)	79.7 $\pm$ 9.2	(13)	75.6 $\pm$ 11.5	(13)	69.5 $\pm$ 17.5	(13)
Days of lactation								
0-4	14.3 $\pm$ 37.0	(12)	23.7 $\pm$ 25.1	(13)	17.2 $\pm$ 19.7	(13)	19.0 $\pm$ 16.8	(12)

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

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

Table 7

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

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

Compound		BCTO							
Groups (mg/kg)		0 ^{a)}		30		125		500	
Days of treatment									
1-2		26.3 $\pm$ 3.7	(13)	26.3 $\pm$ 2.8	(13)	26.8 $\pm$ 2.8	(13)	26.0 $\pm$ 2.7	(13)
7-8		27.1 $\pm$ 2.9	(13)	27.4 $\pm$ 3.1	(13)	27.3 $\pm$ 2.9	(13)	26.7 $\pm$ 1.9	(13)
14-15		27.2 $\pm$ 3.0	(13)	26.9 $\pm$ 4.2	(13)	26.7 $\pm$ 2.9	(13)	26.5 $\pm$ 2.5	(13)
29-30		27.3 $\pm$ 4.3	(13)	27.8 $\pm$ 4.0	(13)	28.1 $\pm$ 3.0	(13)	27.7 $\pm$ 3.5	(13)
35-36		27.5 $\pm$ 3.7	(13)	26.3 $\pm$ 4.2	(13)	26.8 $\pm$ 3.4	(13)	25.9 $\pm$ 2.3	(13)
41-42		26.1 $\pm$ 3.0	(13)	26.5 $\pm$ 4.3	(13)	27.6 $\pm$ 3.2	(13)	26.2 $\pm$ 2.6	(13)

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

Table 8

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

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

Compound		BCTO							
Groups (mg/kg)		0 ^{a)}		30		125		500	
Days of treatment									
1-2		18.9 $\pm$ 3.1	(13)	16.9 $\pm$ 3.1	(13)	20.3 $\pm$ 3.1	(13)	18.9 $\pm$ 3.6	(13)
7-8		18.2 $\pm$ 4.2	(13)	18.6 $\pm$ 2.0	(13)	18.0 $\pm$ 2.4	(13)	19.0 $\pm$ 3.1	(13)
14-15		19.1 $\pm$ 2.8	(13)	19.1 $\pm$ 3.1	(13)	20.2 $\pm$ 3.6	(13)	19.2 $\pm$ 2.5	(13)
Days of pregnancy									
0-1		18.0 $\pm$ 2.7	(12)	18.6 $\pm$ 3.4	(13)	19.7 $\pm$ 1.9	(13)	19.4 $\pm$ 3.1	(13)
7-8		25.5 $\pm$ 4.0	(12)	24.8 $\pm$ 3.2	(13)	26.0 $\pm$ 3.6	(13)	26.0 $\pm$ 2.8	(13)
14-15		24.9 $\pm$ 4.1	(12)	24.7 $\pm$ 3.1	(13)	23.6 $\pm$ 3.0	(13)	24.9 $\pm$ 3.4	(13)
20-21		16.3 $\pm$ 5.2	(12)	20.5 $\pm$ 3.9	(13)	20.7 $\pm$ 4.7	(13)	19.8 $\pm$ 5.4	(13)
Days of lactation									
3-4		33.4 $\pm$ 16.1	(12)	41.9 $\pm$ 11.3	(13)	37.7 $\pm$ 10.1	(13)	37.4 $\pm$ 9.7	(12)

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

Table 9

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

Urinalysis values in animals

Sex	Group (mg/kg)	Number of animals	Color ^{b)}	Turbidity ^{c)}	pH ^{d)}								Total protein ^{e)}				Glucose ^{f)}	Ketone ^{g)}				Bilirubin ^{h)}		Occult blood ⁱ⁾	Urobilinogen ^{j)}	
			ly	-	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	-	-	±	+	++	-	+	-	±	+	
Male	0 ^{a)}	5	5	5	0	0	0	0	1	2	2	0	0	3	2	5	0	1	2	2	5	0	5	3	2	
	30	5	5	5	0	0	0	1	0	2	2	0	0	4	1	5	0	3	2	0	4	1	5	4	1	
	125	5	5	5	0	1	0	0	1	1	2	0	0	2	3	5	0	1	4	0	3	2	5	2	3	
	500	5	5	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	4	1	5	1	3	1	0	5	0	5	5	0	
Female	0 ^{a)}	5	5	5	2	1	1	0	0	0	1	0	1	4	0	5	1	4	0	0	5	0	5	2	3	
	30	5	5	5	0	0	0	4	0	1	0	0	0	4	1	5	1	4	0	0	4	1	5	1	4	
	125	5	5	5	0	0	0	1	2	2	0	2	1	2	0	5	4	1	0	0	5	0	5	3	2	
	500	5	5	5	0	0	2	1	0	1	1	2	0	3	0	5	4	1	0	0	5	0	5	3	2	

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

b) ly, light yellow

c) -, negative

d) 6.0, 6.5 > n ≥ 6.0; 6.5, 7.0 > n ≥ 6.5; 7.0, 7.5 > n ≥ 7.0; 7.5, 8.0 > n ≥ 7.5; 8.0, 8.5 > n ≥ 8.0; 8.5, 9.0 > n ≥ 8.5; ≥ 9.0, ≥ 9.0

e) -, negative; ±, trace; +, 100 > n ≥ 30 mg/dL; ++, 300 > n ≥ 100 mg/dL

f) -, negative

g) -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate

h) -, negative; +, slight

i) -, negative

j) ±, 1.0 > n ≥ 0.1 EU/dL; +, 2.0 >

Table 10

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

Hematological findings in males, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	BCTO							
Groups (mg/kg)	0 ^{a)}		30		125		500	
Red blood cells								
RBC(x10 ⁴ /μ L)	834 ± 39	(13)	833 ± 26	(13)	823 ± 30	(13)	816 ± 52	(13)
Hemoglobin(g/dL)	15.1 ± 0.6	(13)	14.9 ± 0.5	(13)	14.9 ± 0.4	(13)	15.0 ± 0.8	(13)
Hematocrit(%)	44.6 ± 1.7	(13)	44.3 ± 1.6	(13)	44.3 ± 1.3	(13)	44.2 ± 2.3	(13)
MCV(fL)	53.5 ± 1.7	(13)	53.2 ± 1.1	(13)	53.8 ± 2.2	(13)	54.3 ± 1.4	(13)
MCH(pg)	18.1 ± 0.6	(13)	17.9 ± 0.4	(13)	18.1 ± 0.7	(13)	18.4 ± 0.5	(13)
MCHC(g/dL)	33.8 ± 0.3	(13)	33.7 ± 0.3	(13)	33.7 ± 0.3	(13)	33.9 ± 0.2	(13)
White blood cells								
Count(x100/μ L)	62.3 ± 22.0	(13)	64.6 ± 22.2	(13)	71.1 ± 17.8	(13)	69.5 ± 23.8	(13)
Neutrophil(%)	24 ± 13	(13)	28 ± 12	(13)	22 ± 11	(13)	20 ± 6	(13)
Eosinophil(%)	2 ± 1	(13)	2 ± 1	(13)	2 ± 1	(13)	1 ± 0	(13)
Basophil(%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Monocyte(%)	7 ± 3	(13)	7 ± 3	(13)	5 ± 4	(13)	4 ± 2	(13)
Lymphocyte(%)	66 ± 14	(13)	64 ± 14	(13)	71 ± 14	(13)	74 ± 7	(13)
Platelet								
Count(x10 ⁴ /μ L)	105.8 ± 9.5	(13)	104.4 ± 13.6	(13)	104.2 ± 10.4	(13)	112.8 ± 16.0	(13)
PT(sec)	18.1 ± 3.0	(13)	16.6 ± 1.9	(13)	16.0 ± 2.7	(13)	19.1 ± 3.5	(13)
APTT(sec)	23.4 ± 1.6	(13)	22.2 ± 2.2	(13)	21.9 ± 2.2	(13)	24.7 ± 5.5	(13)
Reticulocyte(%)	2.3 ± 0.4	(13)	2.7 ± 0.9	(13)	2.9 ± 1.2	(13)	1.9 ± 0.8	(13)

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

Table 11

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

Hematological findings in females, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound Groups (mg/kg)	BCTO			
	0 ^{a)}	30	125	500
Red blood cells				
RBC($\times 10^4/\mu\text{L}$)	681 $\pm$ 67 (12)	656 $\pm$ 31 (13)	622 $\pm$ 39 ** (13)	632 $\pm$ 44 * (12)
Hemoglobin(g/dL)	13.1 $\pm$ 0.9 (12)	12.9 $\pm$ 0.7 (13)	11.9 $\pm$ 0.9 ** (13)	12.4 $\pm$ 0.9 (12)
Hematocrit(%)	38.6 $\pm$ 2.6 (12)	38.0 $\pm$ 1.9 (13)	35.2 $\pm$ 2.7 ** (13)	36.8 $\pm$ 2.4 (12)
MCV(fL)	56.8 $\pm$ 2.9 (12)	58.0 $\pm$ 1.5 (13)	56.5 $\pm$ 1.8 (13)	58.3 $\pm$ 1.8 (12)
MCH(pg)	19.3 $\pm$ 0.8 (12)	19.7 $\pm$ 0.6 (13)	19.1 $\pm$ 0.7 (13)	19.7 $\pm$ 0.6 (12)
MCHC(g/dL)	34.0 $\pm$ 0.8 (12)	34.0 $\pm$ 0.3 (13)	33.8 $\pm$ 0.6 (13)	33.8 $\pm$ 0.2 (12)
White blood cells				
Count($\times 100/\mu\text{L}$)	100.0 $\pm$ 22.2 (12)	84.1 $\pm$ 28.8 (13)	89.4 $\pm$ 30.3 (13)	68.0 $\pm$ 21.9 * (12)
Neutrophil(%)	30 $\pm$ 17 (12)	16 $\pm$ 6 ** (13)	27 $\pm$ 14 (13)	21 $\pm$ 9 (12)
Eosinophil(%)	1 $\pm$ 1 (12)	1 $\pm$ 1 (13)	1 $\pm$ 1 (13)	1 $\pm$ 1 (12)
Basophil(%)	0 $\pm$ 0 (12)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (12)
Monocyte(%)	7 $\pm$ 5 (12)	7 $\pm$ 3 (13)	7 $\pm$ 4 (13)	7 $\pm$ 3 (12)
Lymphocyte(%)	62 $\pm$ 22 (12)	76 $\pm$ 8 (13)	65 $\pm$ 17 (13)	71 $\pm$ 10 (12)
Platelet				
Count($\times 10^4/\mu\text{L}$)	109.4 $\pm$ 16.8 (12)	117.6 $\pm$ 11.9 (13)	114.5 $\pm$ 16.5 (13)	115.3 $\pm$ 17.2 (12)
PT(sec)	12.9 $\pm$ 0.9 (12)	13.0 $\pm$ 0.7 (13)	12.9 $\pm$ 0.4 (13)	12.6 $\pm$ 0.6 (12)
APTT(sec)	17.2 $\pm$ 1.2 (12)	23.4 $\pm$ 21.2 (12)	17.7 $\pm$ 1.1 (13)	16.9 $\pm$ 1.0 (12)
Reticulocyte(%)	6.9 $\pm$ 3.0 (12)	6.0 $\pm$ 1.7 (13)	6.7 $\pm$ 2.6 (13)	6.2 $\pm$ 2.1 (12)

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

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 12

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

Biochemical findings in males, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound Groups (mg/kg)	BCTO							
	0 ^{a)}		30		125		500	
Total protein(g/dL)	5.5 $\pm$ 0.4	(13)	5.4 $\pm$ 0.3	(13)	5.4 $\pm$ 0.3	(13)	5.1 $\pm$ 0.3 *	(13)
Albumin(g/dL)	3.1 $\pm$ 0.2	(13)	3.0 $\pm$ 0.1	(13)	3.1 $\pm$ 0.2	(13)	2.9 $\pm$ 0.2	(13)
A/G	1.33 $\pm$ 0.15	(13)	1.25 $\pm$ 0.12	(13)	1.35 $\pm$ 0.13	(13)	1.36 $\pm$ 0.16	(13)
BUN(mg/dL)	17 $\pm$ 3	(13)	17 $\pm$ 2	(13)	17 $\pm$ 3	(13)	16 $\pm$ 3	(13)
Creatinine(mg/dL)	0.7 $\pm$ 0.1	(13)	0.7 $\pm$ 0.1	(13)	0.8 $\pm$ 0.1	(13)	0.7 $\pm$ 0.1	(13)
Glucose(mg/dL)	138 $\pm$ 14	(13)	142 $\pm$ 16	(13)	145 $\pm$ 16	(13)	141 $\pm$ 20	(13)
Total cholesterol(mg/dL)	40 $\pm$ 13	(13)	43 $\pm$ 7	(13)	45 $\pm$ 10	(13)	45 $\pm$ 9	(13)
Triglyceride(mg/dL)	36 $\pm$ 12	(13)	38 $\pm$ 13	(13)	38 $\pm$ 14	(13)	38 $\pm$ 11	(13)
ALP(U/L)	207 $\pm$ 42	(13)	191 $\pm$ 25	(13)	245 $\pm$ 52	(13)	290 $\pm$ 110 *	(13)
GPT(U/L)	32 $\pm$ 6	(13)	32 $\pm$ 5	(13)	33 $\pm$ 7	(13)	38 $\pm$ 9	(13)
GOT(U/L)	72 $\pm$ 12	(13)	71 $\pm$ 13	(13)	73 $\pm$ 17	(13)	70 $\pm$ 10	(13)
γ -GTP(U/L)	0 $\pm$ 1	(13)	0 $\pm$ 0 *	(13)	0 $\pm$ 0	(13)	0 $\pm$ 0	(13)
Total bilirubin(mg/dL)	0.08 $\pm$ 0.03	(13)	0.09 $\pm$ 0.04	(13)	0.08 $\pm$ 0.02	(13)	0.08 $\pm$ 0.03	(13)
Inorg. phos.(mg/dL)	5.4 $\pm$ 0.5	(13)	5.4 $\pm$ 0.4	(13)	5.7 $\pm$ 0.6	(13)	5.7 $\pm$ 0.4	(13)
Ca(mg/dL)	8.8 $\pm$ 0.1	(13)	8.8 $\pm$ 0.3	(13)	9.0 $\pm$ 0.2	(13)	8.9 $\pm$ 0.3	(13)
Na(mEq/L)	145.4 $\pm$ 1.0	(13)	145.8 $\pm$ 1.4	(13)	145.4 $\pm$ 1.3	(13)	145.7 $\pm$ 0.6	(13)
K(mEq/L)	3.93 $\pm$ 0.17	(13)	3.90 $\pm$ 0.27	(13)	3.99 $\pm$ 0.29	(13)	3.89 $\pm$ 0.28	(13)
Cl(mEq/L)	108.4 $\pm$ 1.3	(13)	108.5 $\pm$ 2.0	(13)	107.8 $\pm$ 1.5	(13)	108.1 $\pm$ 1.1	(13)

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

*, significantly different from control $p < 0.05$ **, significantly different from control $p < 0.01$

Table 13

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

Biochemical findings in females, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	BCTO							
	0 ^{a)}		30		125		500	
Total protein(g/dL)	5.8 $\pm$ 0.3	(12)	5.6 $\pm$ 0.3	(13)	5.5 $\pm$ 0.3	(13)	5.3 $\pm$ 0.2	** (12)
Albumin(g/dL)	3.3 $\pm$ 0.3	(12)	3.2 $\pm$ 0.2	(13)	3.1 $\pm$ 0.5	(13)	3.1 $\pm$ 0.2	(12)
A/G	1.36 $\pm$ 0.21	(12)	1.37 $\pm$ 0.16	(13)	1.34 $\pm$ 0.36	(13)	1.45 $\pm$ 0.12	(12)
BUN(mg/dL)	30 $\pm$ 37	(12)	15 $\pm$ 4	(13)	14 $\pm$ 5	(13)	16 $\pm$ 3	(12)
Creatinine(mg/dL)	1.0 $\pm$ 0.6	(12)	0.7 $\pm$ 0.1	(13)	0.7 $\pm$ 0.1	(13)	0.6 $\pm$ 0.1	* (12)
Glucose(mg/dL)	125 $\pm$ 11	(12)	123 $\pm$ 12	(13)	129 $\pm$ 8	(13)	139 $\pm$ 10	** (12)
Total cholesterol(mg/dL)	51 $\pm$ 10	(12)	47 $\pm$ 15	(13)	42 $\pm$ 10	(13)	49 $\pm$ 5	(12)
Triglyceride(mg/dL)	68 $\pm$ 54	(12)	37 $\pm$ 11	(13)	51 $\pm$ 14	(13)	49 $\pm$ 18	(12)
ALP(U/L)	117 $\pm$ 42	(12)	103 $\pm$ 15	(13)	129 $\pm$ 54	(13)	139 $\pm$ 48	(12)
GPT(U/L)	38 $\pm$ 6	(12)	38 $\pm$ 5	(13)	43 $\pm$ 7	(13)	41 $\pm$ 9	(12)
GOT(U/L)	76 $\pm$ 13	(12)	71 $\pm$ 6	(13)	76 $\pm$ 10	(13)	77 $\pm$ 22	(12)
γ -GTP(U/L)	0 $\pm$ 0	(12)	0 $\pm$ 1	(13)	0 $\pm$ 0	(13)	0 $\pm$ 0	(12)
Total bilirubin(mg/dL)	0.08 $\pm$ 0.03	(12)	0.08 $\pm$ 0.02	(13)	0.08 $\pm$ 0.02	(13)	0.08 $\pm$ 0.03	(12)
Inorg. phos.(mg/dL)	6.4 $\pm$ 0.5	(12)	6.7 $\pm$ 0.5	(13)	6.3 $\pm$ 0.6	(13)	6.3 $\pm$ 0.4	(12)
Ca(mg/dL)	9.6 $\pm$ 0.3	(12)	9.6 $\pm$ 0.2	(13)	9.6 $\pm$ 0.2	(13)	9.8 $\pm$ 0.3	(12)
Na(mEq/L)	142.4 $\pm$ 2.5	(12)	142.5 $\pm$ 0.9	(13)	142.3 $\pm$ 1.0	(13)	142.7 $\pm$ 0.8	(12)
K(mEq/L)	3.85 $\pm$ 0.62	(12)	4.05 $\pm$ 0.28	(13)	3.92 $\pm$ 0.39	(13)	3.82 $\pm$ 0.21	(12)
Cl(mEq/L)	106.6 $\pm$ 2.5	(12)	107.2 $\pm$ 1.6	(13)	107.2 $\pm$ 0.8	(13)	107.5 $\pm$ 1.8	(12)

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

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

Table 14

Combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test of BCTO by oral administration in rats

Macroscopic findings in males

Groups (mg/kg) Grade	0 ^{a)}		30		125		500	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Testis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small, right side	13	0	13	0	12	1	13	0
Edema, right side	13	0	13	0	12	1	13	0
(Epididymis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Nodule, left side	13	0	13	0	13	0	12	1
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	13	0	12	1
(Stomach)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Thickening, mucosa, forestomach	13	0	13	0	13	0	12	1
Whitish cloudy, mucosa, forestomach	13	0	13	0	13	0	12	1
(Ileum)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Elevated area, on serosa	12	1	13	0	13	0	13	0

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

-, negative; +, positive

[], number of animals examined

Table 15

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

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

Compound		BCTO							
Groups (mg/kg)		0 ^{a)}		30		125		500	
Terminal body weight	(g)	518.5 $\pm$ 41.4	(13)	524.2 $\pm$ 47.9	(13)	522.0 $\pm$ 32.0	(13)	510.3 $\pm$ 23.9	(13)
Brain	(g)	2.08 $\pm$ 0.08 ^{b)}	(13)	2.04 $\pm$ 0.07	(13)	2.05 $\pm$ 0.06	(13)	2.05 $\pm$ 0.08	(13)
		0.41 $\pm$ 0.04 ^{c)}	(13)	0.39 $\pm$ 0.03	(13)	0.39 $\pm$ 0.03	(13)	0.40 $\pm$ 0.02	(13)
Heart	(g)	1.44 $\pm$ 0.10	(13)	1.46 $\pm$ 0.12	(13)	1.45 $\pm$ 0.09	(13)	1.37 $\pm$ 0.11	(13)
		0.28 $\pm$ 0.02	(13)	0.28 $\pm$ 0.02	(13)	0.28 $\pm$ 0.02	(13)	0.27 $\pm$ 0.02	(13)
Thymus	(mg)	305.5 $\pm$ 62.8	(13)	269.3 $\pm$ 66.5	(13)	317.9 $\pm$ 78.1	(13)	299.2 $\pm$ 72.4	(13)
		59.0 $\pm$ 11.8	(13)	51.5 $\pm$ 13.3	(13)	61.3 $\pm$ 16.1	(13)	58.5 $\pm$ 13.3	(13)
Liver	(g)	13.80 $\pm$ 2.11	(13)	13.83 $\pm$ 2.04	(13)	14.78 $\pm$ 1.27	(13)	14.14 $\pm$ 1.13	(13)
		2.65 $\pm$ 0.25	(13)	2.63 $\pm$ 0.22	(13)	2.83 $\pm$ 0.13	(13)	2.77 $\pm$ 0.17	(13)
Kidneys	(g)	3.12 $\pm$ 0.23	(13)	3.14 $\pm$ 0.25	(13)	3.12 $\pm$ 0.24	(13)	2.97 $\pm$ 0.24	(13)
		0.60 $\pm$ 0.06	(13)	0.60 $\pm$ 0.03	(13)	0.60 $\pm$ 0.06	(13)	0.58 $\pm$ 0.03	(13)
Spleen	(g)	0.87 $\pm$ 0.20	(13)	0.90 $\pm$ 0.11	(13)	0.91 $\pm$ 0.12	(13)	0.92 $\pm$ 0.19	(13)
		0.17 $\pm$ 0.03	(13)	0.17 $\pm$ 0.03	(13)	0.17 $\pm$ 0.03	(13)	0.18 $\pm$ 0.03	(13)
Adrenal glands	(mg)	55.2 $\pm$ 8.5	(13)	59.3 $\pm$ 7.6	(13)	59.2 $\pm$ 8.2	(13)	59.5 $\pm$ 7.8	(13)
		10.7 $\pm$ 1.5	(13)	11.4 $\pm$ 2.0	(13)	11.3 $\pm$ 1.2	(13)	11.7 $\pm$ 1.6	(13)
Testes	(g)	3.43 $\pm$ 0.16	(13)	3.34 $\pm$ 0.20	(13)	3.22 $\pm$ 0.21 *	(13)	3.42 $\pm$ 0.22	(13)
		0.67 $\pm$ 0.07	(13)	0.64 $\pm$ 0.06	(13)	0.62 $\pm$ 0.05	(13)	0.67 $\pm$ 0.05	(13)
Epididymides	(g)	1.25 $\pm$ 0.07	(13)	1.26 $\pm$ 0.10	(13)	1.20 $\pm$ 0.13	(13)	1.27 $\pm$ 0.13	(13)
		0.24 $\pm$ 0.02	(13)	0.24 $\pm$ 0.03	(13)	0.23 $\pm$ 0.03	(13)	0.25 $\pm$ 0.03	(13)

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

b) absolute weight

c) relative weight (g or mg per 100g body weight)

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

Table 16

Combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test of BCTO by oral administration in rats

Histological findings in males

Groups (mg/kg)	0 ^{a)}						30						125						500					
Grade	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.
(Testis)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Atrophy, seminiferous tubule, bilateral	12	0	1	0	0	1	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Atrophy, seminiferous tubule, unilateral	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	11	1	0	0	1	2	12	0	1	0	0	1
(Epididymis)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Cell debris, lumen, bilateral	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Cell debris, lumen, unilateral	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	0	0	1	1	12	0	1	0	0	1
Decrease, sperm, lumen, bilateral	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Decrease, sperm, lumen, unilateral	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	0	0	1	1	12	0	0	1	0	1
Spermatic granuloma, left side	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	12	0	0	1	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	11	2	0	0	0	2	11	2	0	0	0	2	12	1	0	0	0	1	12	1	0	0	0	1
(Liver)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	5	0	0	0	5 #
Fatty change, periportal	0	0	7	6	0	13	0	0	7	6	0	13	0	0	8	7	0	13	0	7	6	0	0	** 13
Microgranuloma	9	4	0	0	0	4	8	5	0	0	0	5	9	4	0	0	0	4	9	4	0	0	0	4
(Stomach)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Kidney)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Eosinophilic body	3	0	1	0	1	2													2	1	1	1	0	3
Basophilic tubule, cortex	1	4	0	0	0	4													4	1	0	0	0	1
Cast, cortico-medullary junction	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0
(Spleen)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	0	3	2	0	5													0	0	3	2	0	5
Deposit, pigment, brown	0	2	3	0	0	5													0	5	0	0	0	5
(Ventral prostate)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Cellular infiltration, lymphocyte & plasma cell, interstitium/epithelium	1	0	0	4	0	4													3	1	0	1	0	2
(Urinary bladder)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria	3	2	0	0	0	2													5	0	0	0	0	0
(Lung & Bronchus)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Accumulation, foam cell	2	3	0	0	0	3													1	4	0	0	0	4
Mineralization, artery	5	0	0	0	0	0													4	1	0	0	0	1
(Heart)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Degeneration/fibrosis, myocardium	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0

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

-, negative; +/-, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade

[], number of animals examined

**, significantly different from control $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)#, significantly different from control $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 16 (continued)

Combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test of BCTO by oral administration in rats

Histological findings in males

Groups (mg/kg)	0 ^{a)}	30	125	500
Grade	- +/- + ++ +++ Pos.	- +/- + ++ +++ Pos.	- +/- + ++ +++ Pos.	- +/- + ++ +++ Pos.
(Ileum)	[6]	[0]	[0]	[5]
Diverticulum	5 0 1 0 0 1			5 0 0 0 0 0
(Brain)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Trachea)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Thymus)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Mandibular lymph node)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Seminal vesicle & Coagulating gland)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Duodenum)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Jejunum)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Cecum)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Colon)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Rectum)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Mesenteric lymph node)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Pituitary gland)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Thyroid gland)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Adrenal gland)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Sciatic nerve)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Spinal cord)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Bone marrow of femur)	[5]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				

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

-, negative; +/-, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade

[], number of animals examined

Table 17

Combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test of BCTO by oral administration in rats

Macroscopic findings in females

Groups (mg/kg)		0 ^{a)}		30		125		500	
Grade		-	+	-	+	-	+	-	+
(Thymus)	[12]			[13]		[13]		[12]	
Small		10	2	13	0	12	1	12	0
(Liver)	[12]			[13]		[13]		[12]	
Pale		10	2	13	0	13	0	12	0
Enlargement		12	0	13	0	12	1	12	0
(Spleen)	[12]			[13]		[13]		[12]	
Small		10	2	13	0	13	0	12	0
Enlargement		12	0	13	0	12	1	12	0
Pale		12	0	13	0	13	0	12	0
Area, yellowish white		12	0	13	0	12	1	12	0
Adhesion {with kidney, ovary, stomach & fat tissue}		12	0	13	0	12	1	12	0
(Kidney)	[12]			[13]		[13]		[12]	
Pale		10	2	13	0	13	0	12	0
Dark		12	0	13	0	13	0	12	0
Enlargement		11	1	13	0	13	0	12	0
(Stomach)	[12]			[13]		[13]		[12]	
Thickening, mucosa, forestomach		11	1	13	0	13	0	12	0
Spot, black/dark red, mucosa, glandular stomach		12	0	12	1	13	0	10	2
Yellowish, mucosa, forestomach & glandular stomach		12	0	13	0	13	0	12	0
(Mesenteric lymph node)	[12]			[13]		[13]		[12]	
Enlargement		12	0	13	0	12	1	12	0
(Adrenal gland)	[12]			[13]		[13]		[12]	
Enlargement		12	0	13	0	13	0	12	0
(Bone marrow)	[12]			[13]		[13]		[12]	
Pale		12	0	13	0	12	1	12	0
(Skin)	[12]			[13]		[13]		[12]	
Soiled fur		11	1	13	0	13	0	12	0

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

-, negative; +, positive

[], number of animals examined

One dead animal in the 500 mg/kg group and one non-pregnant animal in the control group were excluded.

Table 18

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

Organ weight of females, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		BCTO							
Groups (mg/kg)		0 ^{a)}		30		125		500	
Terminal body weight	(g)	293.8 $\pm$ 31.8	(12)	310.1 $\pm$ 16.9	(13)	320.0 $\pm$ 21.6 *	(13)	308.0 $\pm$ 15.0	(12)
Brain	(g)	1.92 $\pm$ 0.04 ^{b)}	(12)	1.93 $\pm$ 0.05	(13)	1.94 $\pm$ 0.05	(13)	1.87 $\pm$ 0.06	(12)
		0.66 $\pm$ 0.09 ^{c)}	(12)	0.62 $\pm$ 0.04	(13)	0.61 $\pm$ 0.04	(13)	0.61 $\pm$ 0.03	(12)
Heart	(g)	0.93 $\pm$ 0.07	(12)	0.92 $\pm$ 0.07	(13)	0.96 $\pm$ 0.09	(13)	0.93 $\pm$ 0.05	(12)
		0.32 $\pm$ 0.02	(12)	0.30 $\pm$ 0.02 **	(13)	0.30 $\pm$ 0.02 *	(13)	0.30 $\pm$ 0.01 *	(12)
Thymus	(mg)	152.3 $\pm$ 74.3	(12)	203.9 $\pm$ 86.2	(13)	210.2 $\pm$ 87.2	(13)	202.0 $\pm$ 59.4	(12)
		50.0 $\pm$ 22.7	(12)	65.8 $\pm$ 28.4	(13)	65.1 $\pm$ 24.5	(13)	65.3 $\pm$ 17.5	(12)
Liver	(g)	9.83 $\pm$ 0.92	(12)	10.12 $\pm$ 0.83	(13)	11.43 $\pm$ 2.41 *	(13)	11.39 $\pm$ 1.00 **	(12)
		3.37 $\pm$ 0.31	(12)	3.26 $\pm$ 0.23	(13)	3.57 $\pm$ 0.69	(13)	3.70 $\pm$ 0.23 *	(12)
Kidneys	(g)	1.99 $\pm$ 0.29	(12)	1.94 $\pm$ 0.16	(13)	2.02 $\pm$ 0.23	(13)	2.04 $\pm$ 0.23	(12)
		0.69 $\pm$ 0.18	(12)	0.63 $\pm$ 0.05	(13)	0.63 $\pm$ 0.07	(13)	0.66 $\pm$ 0.05	(12)
Spleen	(g)	0.66 $\pm$ 0.20	(12)	0.71 $\pm$ 0.09	(13)	0.85 $\pm$ 0.50	(13)	0.70 $\pm$ 0.10	(12)
		0.22 $\pm$ 0.06	(12)	0.23 $\pm$ 0.03	(13)	0.26 $\pm$ 0.14	(13)	0.23 $\pm$ 0.03	(12)
Adrenal glands	(mg)	84.0 $\pm$ 13.7	(12)	75.0 $\pm$ 8.7	(13)	77.4 $\pm$ 12.7	(13)	72.9 $\pm$ 8.0	(12)
		29.4 $\pm$ 8.7	(12)	24.2 $\pm$ 3.0	(13)	24.2 $\pm$ 3.9	(13)	23.7 $\pm$ 2.6	(12)

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

b) absolute weight

c) relative weight (g or mg per 100g body weight)

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 19

Combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test of BCTO by oral administration in rats

Histological findings in females

Groups (mg/kg)	0 ^{a)}						30						125						500					
Grade	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.
(Ovary)	[12]						[13]						[13]						[12]					
No remarkable change																								
(Liver)	[12]						[0]						[1]						[12]					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	12	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
Fatty change, periportal	0	9	1	1	1	12							1	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Microgranuloma	10	2	0	0	0	2							0	1	0	0	0	1	9	3	0	0	0	3
Necrosis, focal, subcapsule	12	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0	11	1	0	0	0	1
Proliferation, Kupffer cell, with swelling, sinusoid	12	0	0	0	0	0							0	0	0	1	0	1	12	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, neutrophil & lymphocyte, sinusoid	12	0	0	0	0	0							0	0	1	0	0	1	12	0	0	0	0	0
Hyperplasia, bile duct	12	0	0	0	0	0							0	0	1	0	0	1	12	0	0	0	0	0
(Stomach)	[12]						[13]						[13]						[12]					
Squamous hyperplasia, forestomach	9	3	0	0	0	3	9	4	0	0	0	4	11	2	0	0	0	2	7	5	0	0	0	5
Ulcer, mucosa, focal, forestomach	12	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
Erosion, mucosa, diffuse, forestomach	12	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	11	1	0	0	0	1
(Kidney)	[6]						[0]						[0]						[6]					
Basophilic tubule, cortex	3	1	1	1	0	3													4	2	0	0	0	2
Necrosis, proximal tubule, cortex	4	0	1	1	0	2													6	0	0	0	0	0
Dilatation, lumen, diffuse, with cell debris, distal tubule, cortex	4	1	0	1	0	2													6	0	0	0	0	0
Degeneration, vacuolar, proximal tubule, cortex	4	0	0	2	0	2													5	1	0	0	0	1
Deposit, pigment, hemoglobin, proximal tubule, cortex	6	0	0	0	0	0													6	0	0	0	0	0
Cast, hemoglobin, cortex & medulla	6	0	0	0	0	0													6	0	0	0	0	0
Mineralization	6	0	0	0	0	0													4	2	0	0	0	2
(Spleen)	[6]						[0]						[1]						[6]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	2	1	3	0	6							0	0	0	1	0	1	0	0	2	4	0	6
Deposit, pigment, brown	0	3	2	1	0	6							0	1	0	0	0	1	0	3	3	0	0	6
Atrophy, red pulp	4	0	0	2	0	2							1	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Atrophy, white pulp	6	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Necrosis, focal	6	0	0	0	0	0							0	0	0	0	1	1	6	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, neutrophil & macrophage	6	0	0	0	0	0							0	0	0	1	0	1	6	0	0	0	0	0
Proliferation, fibroblast, necrotized area	6	0	0	0	0	0							0	0	1	0	0	1	6	0	0	0	0	0
(Thymus)	[4]						[0]						[1]						[6]					
Atrophy	3	0	0	0	1	1							0	0	1	0	0	1	4	1	1	0	0	2
(Adrenal gland)	[6]						[0]						[0]						[6]					
Lipid droplet, increase, zona fasciculate	6	0	0	0	0	0													6	0	0	0	0	0

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

-, negative; +/-, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade

[], number of animals examined

One dead animal in the 500 mg/kg group and one non-pregnant animal in the control group were excluded.

Table 19 (Continued)

Combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test of BCTO by oral administration in rats

Histological findings in females

Groups (mg/kg)	0 ^{a)}						30						125						500							
	Grade	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	
(Lung & Bronchus)	[6]							[0]						[0]						[6]						
Accumulation, foam cell		1	5	0	0	0	5														4	2	0	0	0	2
Mineralization, artery		5	1	0	0	0	1														6	0	0	0	0	0
(Mesenteric lymph node)	[6]							[0]						[1]						[6]						
Proliferation, macrophage, sinus		6	0	0	0	0	0							0	0	1	0	0	1		6	0	0	0	0	0
Proliferation, plasma cell, medullary cord		6	0	0	0	0	0							0	0	1	0	0	1		6	0	0	0	0	0
(Bone marrow of femur)	[6]							[0]						[1]						[6]						
Hematopoiesis, increase, granulopoiesis		6	0	0	0	0	0							0	0	0	1	0	1		6	0	0	0	0	0
(Brain)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Spinal cord)	[6]							[0]						[0]						[5]						
No remarkable change																										
(Trachea)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Mandibular lymph node)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Heart)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Urinary bladder)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Uterus)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Vagina)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Duodenum)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Jejunum)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Ileum)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Cecum)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Colon)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Rectum)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Pituitary gland)	[6]							[0]						[0]						[5]						
No remarkable change																										
(Thyroid gland)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										
(Sciatic nerve)	[6]							[0]						[0]						[6]						
No remarkable change																										

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

-, negative; +/-, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade

[], number of animals examined

Table 20

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

Estrous cycles

Compound	BCTO			
	0 ^{a)}	30	125	500
Groups (mg/kg)				
Number of females examined	13	13	13	13
Type of cycle during pre-treatment period; N				
4-day cycle	13	13	13	13
Types of cycle during treatment period; N				
4-day cycle	12	13	13	13
Irregular cycle	1	0	0	0
Mean length of estrous cycle in days; Mean $\pm$ S.D				
Pre-treatment period	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0
Treatment period	4.1 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0
Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean $\pm$ S.D.	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0

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

Table 21

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

Reproductive performance

Compound	BCTO			
Groups (mg/kg)	0 ^{a)}	30	125	500
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant animals	12	13	13	13
Fertility index ^{c)}	92.3	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation				
Mean $\pm$ S.D. (N)	2.3 $\pm$ 1.3 (13)	2.5 $\pm$ 1.1 (13)	1.8 $\pm$ 1.0 (13)	2.2 $\pm$ 1.1 (13)

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

b) copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs) $\times$ 100, %c) fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs) $\times$ 100, %

Table 22

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

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

Compound	BCTO			
Groups (mg/kg)	0 ^{a)}	30	125	500
Number of pregnant females	12	13	13	13
Number of females with live pups	12	13	13	12 ^{b)}
Gestation index ^{c)}	100	100	100	92.3
Gestation length in days	22.6 $\pm$ 0.5 (12)	22.2 $\pm$ 0.4 (13)	22.5 $\pm$ 0.5 (13)	22.6 $\pm$ 0.5 (12)
Number of corpora lutea	17.3 $\pm$ 1.5 (12)	17.9 $\pm$ 2.5 (13)	17.0 $\pm$ 1.8 (13)	16.9 $\pm$ 2.3 (13)
Number of implantation sites	15.8 $\pm$ 1.5 (12)	16.3 $\pm$ 1.4 (13)	15.8 $\pm$ 1.3 (13)	15.2 $\pm$ 2.6 (13)
Implantation index ^{d)}	91.6 $\pm$ 7.8 (12)	91.6 $\pm$ 6.5 (13)	93.6 $\pm$ 6.1 (13)	90.3 $\pm$ 12.8 (13)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	14.7 $\pm$ 2.3 (12)	15.2 $\pm$ 1.9 (13)	14.7 $\pm$ 1.4 (13)	13.3 $\pm$ 4.0 (12)
Delivery index ^{e)}	92.8 $\pm$ 7.4 (12)	93.3 $\pm$ 7.1 (13)	92.9 $\pm$ 6.5 (13)	88.1 $\pm$ 20.7 (12)
Number of live pups	14.1 $\pm$ 1.8 (12)	15.1 $\pm$ 1.8 (13)	14.5 $\pm$ 1.4 (13)	13.2 $\pm$ 4.0 (12)
Birth index ^{f)}	89.5 $\pm$ 7.8 (12)	92.4 $\pm$ 7.3 (13)	91.9 $\pm$ 6.8 (13)	86.9 $\pm$ 20.1 (12)
Live birth index ^{g)}	96.6 $\pm$ 6.3 (12)	99.1 $\pm$ 2.3 (13)	99.0 $\pm$ 2.5 (13)	98.8 $\pm$ 2.8 (12)
Sex ratio on day 0 ^{h)}	45.3 $\pm$ 12.9 (12)	53.5 $\pm$ 12.3 (13)	46.6 $\pm$ 11.5 (13)	53.0 $\pm$ 18.2 (12)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	13.8 $\pm$ 1.7 (12)	14.8 $\pm$ 1.6 (13)	14.3 $\pm$ 1.1 (13)	12.9 $\pm$ 3.9 (12)
Viability index ⁱ⁾	98.3 $\pm$ 4.1 (12)	98.6 $\pm$ 2.7 (13)	98.6 $\pm$ 3.6 (13)	98.4 $\pm$ 5.4 (12)
Sex ratio on day 4 ^{j)}	44.8 $\pm$ 12.4 (12)	53.2 $\pm$ 12.4 (13)	46.3 $\pm$ 11.4 (13)	53.5 $\pm$ 17.4 (12)

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

b) one female (animal number; FB04009) was died on day 23 of gestation

c) gestation index = (number of females with live pups / number of pregnant females) $\times$ 100, %d) implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea) $\times$ 100, %e) delivery index = (number of pups born / number of implantation sites) $\times$ 100, %f) birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantation sites) $\times$ 100, %g) live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born) $\times$ 100, %h) sex ratio on day 0 = (number of male live pups on day 0 / number of live pups on day 0) $\times$ 100, %i) viability index = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 0) $\times$ 100, %j) sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 / number of live pups on day 4) $\times$ 100, %

Table 23

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

Body weight of pups up to day 4 of lactation, g, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	BCTO			
	0 ^{a)}	30	125	500
Day 0 of lactation				
Weight of pup				
Male	7.1 $\pm$ 0.8 (12)	6.8 $\pm$ 0.5 (13)	7.1 $\pm$ 0.8 (13)	7.2 $\pm$ 1.0 (12)
Female	6.7 $\pm$ 0.8 (12)	6.4 $\pm$ 0.5 (13)	6.5 $\pm$ 0.7 (13)	6.9 $\pm$ 1.0 (12)
Day 4 of lactation				
Weight of pup				
Male	10.6 $\pm$ 2.6 (12)	10.5 $\pm$ 1.5 (13)	11.1 $\pm$ 1.6 (13)	11.5 $\pm$ 2.3 (12)
Female	10.2 $\pm$ 2.7 (12)	10.0 $\pm$ 1.3 (13)	10.4 $\pm$ 1.4 (13)	11.1 $\pm$ 2.3 (12)

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