



o-sec-ブチルフェノールのラットを
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	3
試験材料および方法	4
1. 被験物質および投与検体の調製	4
2. 使用動物および飼育条件	4
3. 群分けおよび個体識別	5
4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法	5
5. 観察方法	6
6. 統計解析	9
結 果	11
I. 反復投与毒性（親動物所見）	11
1. 一般状態	11
2. 体重	11
3. 摂餌量	11
4. 解剖時検査所見	12
II. 生殖発生毒性	16
1. 生殖関連所見	16
2. 出生児所見	16
考 察	18
文 献	20

Figures (Figure 1～Figure 4)

TABLE INDEX

Tables (Table 1～Table 27)

【要 約】

OECD 既存化学物質安全性スクリーニング試験の一環として、*o*-sec-ブチルフェノール (以下 OSBP) の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行った。すなわち、OSBP の 0 (媒体)、12、60 および 300 mg/kg を Sprague-Dawley 系 [Crj:CD (IGS)] ラットの雌雄 (各13匹/群) に交配前2週間および交配期間2週間経口投与し、さらに雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して、親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。結果は以下のように要約される。

I. 反復投与毒性 (親動物所見)

死亡動物は、対照群を含むいずれの投与群においても認められなかった。

300 mg/kg 投与群において、雌雄ともに投与後一過性の流涎および活動性の低下 (自発運動の減少、腹臥位または横臥位、寄り掛かり姿勢)、半眼が、さらに、雌ではふらつき歩行も観察された。同群では、肝臓の比体重値が雌雄ともに増加した。肝臓の病理組織学検査の結果、雄に小葉中心性の肝細胞の肥大が観察されたが、雌には認められなかった。また、雄について実施した血液生化学検査では、300 mg/kg 投与群で、総コレステロール濃度の増加が認められた。摂餌量および体重には、雌雄ともに OSBP 投与による影響は認められなかった。雄について実施した血液学検査にも OSBP 投与の影響は認められなかった。60 mg/kg 投与群では、投与期間初期に自発運動の減少が少数例の雄に観察されたが、雌には一般状態の変化は認められなかった。12 mg/kg 投与群には OSBP 投与の影響は認められなかった。

II. 生殖発生毒性

雌雄動物の交尾率、受胎率、雌動物の妊娠維持、分娩および哺育ならびに産児の生存性、性比、発育および形態に、OSBP 投与の影響は認められなかった。

III. 評価

以上の試験成績から、本試験条件下では、OSBP の反復投与毒性に関する無影響量は、雄では 12 mg/kg/day、雌では 60 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、雌雄

および産児ともに 300 mg/kg/day であると判断される。

【緒 言】

o-sec-ブチルフェノール（以下、OSBP）のラットでのLD₅₀値は経口投与では 2.7 g/kg¹⁾、マウスでのLD₅₀値は腹腔内投与では 63 mg/kg²⁾、静脈内投与では 60 mg/kg³⁾、モルモットでのLD₅₀値は経口投与および経皮投与では 600 mg/kg⁴⁾であることが知られている。また、OSBP の類似体である *p*-tert-ブチルフェノールについては、ラットを用いた反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験が行われている⁵⁾。しかし、OSBP の反復投与毒性および生殖発生毒性については明らかにされていない。そこで今回、OECD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として OSBP の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（以下、併合試験）を行い、同化合物の雌雄ラットに及ぼす反復投与毒性ならびに生殖発生毒性について検討したので、その結果を報告する。

【試験材料および方法】

1. 被験物質および投与検体の調製

o-*sec*-ブチルフェノール（以下、OSBP）〔CAS No.: 89-72-5、分子式: $C_{10}H_{14}O$ 、分子量: 150.21、英名: *o*-*sec*-Butylphenol、比重: 0.984/20℃)、融点: 15.7℃、沸点: 227℃〕は、無色または微黄色の透明液体である。併合試験に使用した OSBP〔Lot No.: 純度: 99.15 %、不純物 (*p*-*sec*-ブチルフェノール): 0.83%〕は、使用時まで室温、遮光条件下で保管した。また、投与期間中安定であったことが確認された (Annexes 1-1、1-2)。

被験物質は、コーン油〔ナカライテスク(株)、Lot No.: V7R2020〕にて溶解し、いずれの用量においても1回の投与液量が2 mL/kg 体重になるように濃度を調整した。調製検体は、室温、遮光条件下で保管し、調製後7日以内に投与した。なお、0.2 および20% (w/v) の濃度の調製液については、室温、遮光条件下で少なくとも8日間安定であることが、併合試験に先立って実施された「*o*-*sec*-ブチルフェノールのラットを用いる単回投与毒性予備試験」において確認されており (Annex 2)、本試験中に調製した投与検体 (0.6、3、15%) には、所定濃度の OSBP が含有されていたことを確認した (Annex 3)。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入（入荷日、雌雄とも1998年2月4日）した日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産の Sprague-Dawley 系ラット〔Crj:CD(SD) IGS、SPF〕を使用した。購入した動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、試験に供した。なお、動物の入荷、検疫および群分け時の体重範囲を、Annex 4 に示した。

各動物は、基準温度 24 ± 1 ℃および基準湿度50～65%、換気回数約15回/時、照明12時間（午前7時～午後7時）に制御された飼育室で、金属製ケージ（220^W × 270^D × 190^H mm）に個別に収容して飼育し、固型飼料（CE-2、日本クレア(株)）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させた。妊娠14日（交尾確認日＝妊娠0日）以後の雌動物については、ラット用繁殖ケージ（350^W × 400^D × 180^H mm）に収容し、床敷として紙パルプ製チップ（ALPHA-dri、加商(株)）を適宜供給した。なお、飼育期間中、飼育室の湿度の実測値は、それぞれ23.0～25.5℃、49.5～65.0%と基準値をわずかながらはずれる

値を示したが、いずれも1時間以内の逸脱であり、それ以外は基準値の範囲内にあった。また、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認められなかった。

3. 群分けおよび個体識別

雌雄とも投与開始日（投与1日）の体重をもとに、体重別層化無作為抽出法により群分けし、各群とも雌雄各13匹を配した。

群分け後、これらのすべての雌雄動物には、油性フェルトペンを用いて尾に個体識別番号を示す番号を記入した。また、個体識別を容易にする目的で、群毎に色彩の異なる動物カードを各飼育ケージに掛け、これに試験計画番号および個体識別番号を記入した。なお、産児については、個体の識別を行わなかった。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

OSBPの投与量は、予備試験の結果を参考に設定した。予備試験では、OSBPの0（コーン油）、30、100、300 mg/kgを雌雄ラット〔Crj:CD(SD)IGS、SPF〕に14日間強制的に連続経口投与した。その結果、100 mg/kg以上の投与群では自発運動減少および流涎が、300 mg/kg投与群ではこれらの変化に加え、腹臥位姿勢、寄り掛かり姿勢、ふらつき歩行、眼瞼下垂がそれぞれ投与後に認められた。摂餌量にはOSBP投与の影響は認められなかったが、雄の100 mg/kg以上の投与群および雌の300 mg/kg投与群において体重の増加抑制傾向が認められた。また、雄では、300 mg/kg投与群の肝臓の比体重値が対照群と比較して有意に増加し、肝臓の絶対重量が増加傾向を示した。雌では、肝臓の比体重値が増加傾向を示した。尿検査、血液生化学検査、血液学検査および剖検所見には雌雄とも、OSBP投与による変化は認められなかった。

以上の成績から、14回の反復投与により、雌雄の一般状態、体重および肝臓重量に影響が認められたが、その他の検査項目にはOSBP投与による著しい変化が認められなかった300 mg/kgを本試験の高用量に設定し、以下、公比5で減じて中用量には60 mg/kgを、低用量には12 mg/kgを設定した。なお、対照群にはコーン油をOSBP投与群と同一条件にて投与した。以下に群構成を示す。

群番号	被験物質	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	OSBP	12	13 (MX02001~MX02013)	13 (FB02001~FB02013)
3	OSBP	60	13 (MX03001~MX03013)	13 (FB03001~FB03013)
4	OSBP	300	13 (MX04001~MX04013)	13 (FB04001~FB04013)

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前2週間と交配期間(2週間)および交配期間終了後2週間(剖検日前日までの連続42日間)、また、雌に対しては交配前2週間と最長2週間の交配期間中(交尾まで)、ならびに交尾成立雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日(分娩日=哺育0日)まで毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した(投与開始日、雌雄とも1998年2月11日)。毎日の投与は、午前9時から12時の間に行い、各動物の投与液量(2 mL/kg 体重)は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回測定した体重をもとに、また、交尾後の雌については妊娠0日の体重をもとにそれぞれ算出した。

5. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態の観察

雌雄とも全例について、飼育期間中毎日1回以上観察した。

B. 体重測定

雄は全例について、投与1、8、15、22、29、36、42日および解剖日に、雌は全例について、投与1、8、15日に測定し、投与22日までに交尾しなかった雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾雌では、妊娠0、7、14、20日に、分娩した雌では哺育0および4日(解剖日)に体重を測定した。

C. 摂餌量測定

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

D. 交配

交配は、投与15日の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾の確認は、毎朝、腔栓および腔垢標本中の精子の存在を調べることにより行い、交尾

が確認された雌は、その日を妊娠 0 日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配の結果から、交尾率〔(交尾動物数/交配動物数) × 100〕、受胎率〔(妊娠動物数/交尾動物数) × 100〕、同居開始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。

E. 分娩および哺育状態の観察

各群とも交尾雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態が直接観察できた動物についてはその状態を観察し、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困難や遅延などの分娩障害の有無を判断して記録した。分娩後は哺育状態を毎日観察した。

F. 分娩日の規定

分娩の確認は、午前 9 時～11 時に限定し、この時間帯に分娩が終了していることを確認した動物について、その日を分娩日と規定した。午前 11 時を過ぎて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。分娩を確認した全例について、妊娠期間（妊娠 0 日から分娩日までの日数）を算定し、出産率〔(生児出産雌数/妊娠動物数) × 100〕を各群について求めた。

G. 剖検

a) 雄動物

1. 血液学検査

全例について、42 回投与後に 18～24 時間絶食させ、剖検に先立ち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 EDTA-2K を用いて採血し、以下の項目について検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
赤血球数 (RBC)	自動 (電気抵抗法)	Coulter Counter Model S-PLUS IV (コルター・エレクトロニクス)
白血球数 (WBC)	" (電気抵抗法)	"
血色素量 (Hb)	" (吸光度法)	"
平均赤血球容積 (MCV)	" (電気抵抗法)	"
血小板数	" (電気抵抗法)	"
ヘマトクリット値 (Ht)	計算 (RBC × MCV × 0.001)	
平均赤血球血色素量 (MCH)	" (Hb × 1000 / RBC)	
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	" (Hb × 100 / Ht)	
白血球分類	視算 (静脈血塗抹標本, Wright-Giemsa 染色)	光学顕微鏡

ロ. 血液生化学検査

全例について、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を行った。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
総蛋白濃度	ビウレット法	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	〃
総コレステロール濃度	COD・DAOS法	〃
ブドウ糖濃度	グルコキナーゼ G6PDH 法	〃
尿素窒素濃度 (BUN)	ウレアーゼ G.DH 法	〃
クレアチニン濃度	Jaffé 法 (Rate)	〃
アルカリフォスファターゼ活性 (ALP)	GSCC法	〃
GOT 活性	IFCC法	〃
GPT 活性	IFCC法	〃
γ-GTP 活性	γ-グルタミル-3-カルボキシ- 4-ニトロアミド 基質法	〃
トリグリセリド濃度	GPO・DAOS法	〃
無機リン濃度 (Inorg. phos.)	モリブデン酸直接法	〃
総ビリルビン濃度	Jendrassik/Grof 法	〃
カルシウム濃度	OCPC法	〃
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	イオン電極法	〃
塩素濃度	イオン電極法	〃

ハ. 病理学検査

採血後、全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行った。その際、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。精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存し、残りの重量測定済み器官、膀胱および剖検時に異常が認められた器官（肺、胃）は、10%ホルマリン液に固定して保存した。これらの器官は、常法に従ってパラフィン切片とし、高用量群および対照群についてヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を実施した。病理組織学検査の結果、高用量群で異常が認められた肝臓および心臓については、他の投与群についても病理組織学検査を実施した。なお、剖検時に病変が認められた肺および胃については、OSBP 投与による影響ではないと判断し、病理組織学検査を実施しなかった。

ビ. 雌動物

分娩した動物は哺育 4 日に、交尾は確認されたが分娩しなかった動物は妊娠 25 日相当日に、それぞれペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させて剖検した。その際、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数えた後、ブアン液に保存

した。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、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および副腎の重量を測定し、併せて比体重値(相対重量)を算出した。重量測定済み器官、膀胱、子宮および剖検時に異常が認められた器官(肺、胃、乳腺)は、10%ホルマリン液に固定して保存した。これらの器官(卵巣および子宮を除く)は、常法に従ってパラフィン切片とし、高用量群および対照群についてヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を行った。不妊例の卵巣についても病理組織学検査を実施した。剖検時に病変が認められた肺および胃については、OSBP 投与による影響ではないと判断し、病理組織学検査を実施しなかった。

2) F₁ 産児

A. 産児数の算定

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

B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、出生率〔(出產生児数/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。死亡児は剖検し、異常が認められた器官は10%ホルマリン液に保存した。

C. 体重測定

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

D. 剖検

哺育4日に全例を剖検し、異常が認められた器官は10%ホルマリン液に保存した。

6. 統計解析

交尾率、受胎率および産児の形態異常頻度については Yates の補正を含む χ^2 検定を行った。病理組織所見については、グレード分けしたデータは Mann-Whitney の U 検定^{6), 7)} を、陽性グレードの合計値は Fisher 直接確率の片側検定⁷⁾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一腹ごとの平均値を1標本として、先ず

Bartlett 法⁸⁾により各群の分散の一樣性について検定した。その結果、分散が一樣とされた場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合には、各群の匹数が同一であれば Dunnett 法⁹⁾を用い、同一でない場合は Scheffé 法¹⁰⁾を用いて対照群と OSBP 各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が一樣でなかった場合、または分散が 0 となる群が存在した場合は、Kruskal-Wallis 順位検定¹¹⁾を行い、群間に有意性が認められた場合に、対照群と OSBP 各投与群との差について Dunnett 法あるいは Scheffé 法の検定を行った。なお、有意水準は、5%および1%とした。

【結 果】

I. 反復投与毒性（親動物所見）

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

雌雄ともに、いずれの投与群においても死亡あるいは瀕死動物は認められなかった。

雄では、60 mg/kg 投与群の2匹に自発運動の減少、1匹に投与後の一過性の流涎が投与期間初期に、300 mg/kg 投与群の全例に投与後の一過性の流涎、自発運動の減少が投与期間を通じて観察され、9匹に腹臥位または横臥位、2匹に半眼、1匹に寄り掛かり姿勢が投与期間初期にそれぞれ観察された。雌では、300 mg/kg 投与群の全例に投与後の一過性の流涎、自発運動の減少、腹臥位または横臥位が、10匹にふらつき歩行がほぼ投与期間を通じて観察され、7匹に半眼、3匹に寄り掛かり姿勢が投与開始から投与期間中期までそれぞれ観察された。これらの変化は、翌日の投与までには回復する変化であった。対照群および 12 mg/kg 投与群の雌雄ならびに 60 mg/kg 投与群の雌には、一般状態の異常は認められなかった。

2. 体重

1) 雄（Figure 1；Tables 3、4；Appendices 3-1～4-4）

300 mg/kg 投与群において、投与開始後、体重実測値および体重増加量が低下傾向を示したが、対照群と OSBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 雌（Figure 2；Tables 5～10；Appendices 5-1～10-4）

交配前、妊娠期および哺育期のいずれの時期においても、体重実測値および体重増加量には、対照群と OSBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3. 摂餌量

1) 雄（Figure 3；Table 11；Appendices 11-1～11-4）

投与期間中の摂餌量には、対照群と OSBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 雌（Figure 4；Tables 12～14；Appendices 12-1～14-4）

300 mg/kg 投与群において、妊娠 0～7 日の摂餌量が対照群と比較して有意 ($p<0.05$)

な低値を示した。交配前および哺育期の摂餌量には、対照群と OSBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

4. 解剖時検査所見

1) 雄

(1) 血液学検査所見 (Table 15; Appendices 15-1~15-4)

300 mg/kg 投与群において、血色素量およびヘマトクリット値が対照群と比較して有意 ($p<0.05$, 0.01) な低値を示した。赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、白血球数および白血球分類には、対照群と OSBP 各投与群との間に有意差は認められなかったが、300 mg/kg 投与群において赤血球数および白血球数が低下傾向を示した。

(2) 血液生化学検査所見 (Table 16; Appendices 16-1~16-4)

300 mg/kg 投与群において、総コレステロール濃度が対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な高値を、塩素濃度が有意 ($p<0.01$) な低値を示した。また、12 mg/kg 投与群において、A/G 比が有意な低値を示したが、用量に依存した変化ではなかった。その他の検査項目には対照群と OSBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

(3) 剖検所見 (Table 17; Appendix 17)

肝臓では、対照群および 12 mg/kg 投与群各 1 匹、300 mg/kg 投与群 2 匹に白色あるいは淡色斑が、300 mg/kg 投与群 1 匹に横隔膜結節が、対照群 2 匹、12 および 60 mg/kg 投与群各 1 匹に黄色化が、対照群 3 匹、60 mg/kg 投与群 1 匹に小葉構造の明瞭化が観察された。腎臓では、60 mg/kg 投与群 1 匹、300 mg/kg 投与群 2 匹に皮質の陥凹部が、対照群および 300 mg/kg 投与群各 1 匹に皮質の淡色の斑あるいは領域が、60 mg/kg 投与群 1 匹に左側腎盂拡張および他の 1 匹に右側の皮髄境界部に嚢胞が観察された。肺では、対照群 1 匹および 12 mg/kg 投与群 2 匹に暗色点が、60 mg/kg 投与群 1 匹に右側肺門部の水腫が観察された。そのほかの所見として、60 mg/kg 投与群 1 匹の前胃粘膜に水腫様部位が、12 mg/kg 投与群 2 匹の脾臓に副脾が、対照群 1 匹の精巣に小型化が、300 mg/kg 投与群 1 匹の会陰部の皮膚に汚染がそれぞれ観察された。

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

300 mg/kg 投与群において、肝臓の比体重値が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に増加した。脳、心臓、胸腺、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量および比体重値には、対照群と OSBP 各投与群との間に統計学的有意差は認められなかったが、300 mg/kg 投与群において腎臓の重量および比体重値が増加傾向を示し、副腎の重量および比体重値が低下傾向を示した。なお、300 mg/kg 投与群の解剖時体重が低下傾向を示した。

(5) 病理組織学検査所見 (Table 19; Appendix 19)

各器官の観察所見を以下に示す。

(肝臓)

300 mg/kg 投与群 6 匹に小葉中心性の肝細胞肥大 (Photos 1, 2) が観察され、その頻度は対照群と比較して有意 ($p < 0.01$) に増加した。この変化は、60 mg/kg 以下の投与群では認められず、300 mg/kg 投与群の肝細胞肥大の程度も対照群と比較してごく軽度であった。また、対照群および OSBP 投与群の全例に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化が観察され、300 mg/kg 投与群におけるその程度は対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に低下した。そのほかに、対照群および 12 mg/kg 投与群各 5 匹、60 および 300 mg/kg 投与群各 2 匹に小肉芽腫が、対照群 1 匹、60 mg/kg 投与群 2 匹および 300 mg/kg 投与群 1 匹に限局性の壊死が、60 mg/kg 投与群 1 匹に限局性の出血が、12 mg/kg 投与群 2 匹に被膜の限局性の線維化が、同 1 匹に肝細胞の限局性の脂肪変性が観察されたが、これらの所見に程度および頻度の差は認められなかった。また、横隔膜結節が肉眼的に観察された 1 匹には、被膜に限局性の線維化および被膜の一部に肉芽組織が観察された。

(腎臓)

対照群および 300 mg/kg 投与群各 4 匹に eosinophilic body が、対照群 10 匹および 300 mg/kg 投与群 11 匹の皮質に好塩基性尿細管が、300 mg/kg 投与群 1 匹の皮髄境界部に尿細管の嚢胞が、対照群 1 匹および 300 mg/kg 投与群 2 匹の間質にリンパ球の浸潤が、300 mg/kg 投与群 1 匹の皮質に円柱が観察されたが、いずれも両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

(脾臓)

対照群および 300 mg/kg 投与群の全例に髄外造血および褐色色素沈着が観察されたが、両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

(精巣および精巣上体)

対照群 4 匹、300 mg/kg 投与群 3 匹に生殖細胞の減少を伴う精細管の萎縮が観察され、そのうちの対照群 1 匹の精細管内には多核巨細胞が出現し、生殖細胞の減少が明瞭であった。この例の精巣上体では、管腔内の精子の減少や細胞残屑が認められた。また、対照群 1 匹および 300 mg/kg 投与群 2 匹に精巣上体の間質にリンパ球の浸潤が観察された。

(心臓)

12 および 300 mg/kg 投与群各 2 匹、60 mg/kg 投与群 3 匹に心筋変性が観察された。この変化は、細胞浸潤を伴い、かつ変性している領域は狭く、限局性あるいは散在性に存在しており、その程度および頻度に差は認められなかったことから自然発生的な変化と考えられた。

(膀胱)

300 mg/kg 投与群 1 匹に粘膜固有層にリンパ球の浸潤が観察された。

(その他)

脳、胸腺および副腎に異常は観察されなかった。

2) 雌

(1) 剖検所見 (Table 20; Appendix 20)

60 mg/kg 投与群 1 匹に左側脳室の拡張が観察された。肝臓では、300 mg/kg 投与群 1 匹に淡色化を伴う腫大が、12 mg/kg 投与群 1 匹に淡色斑が観察された。さらに、対照群の 1 匹では、肝臓の尾状葉は暗色化を伴い硬化しており、白色斑が散在していた。腎臓では、300 mg/kg 投与群 3 匹に淡色化が、60 mg/kg 投与群 1 匹に右側腎盂拡張が、12 mg/kg 投与群 1 匹の皮髄境界部に嚢胞が観察された。肺では、対照群、12 および 300 mg/kg 投与群各 1 匹に暗色点が観察された。胃では、対照群および 60 mg/kg 投与群の各 1 匹に腺胃粘膜に黄色域あるいは赤色点散在が観察された。胸腺では、12 mg/kg 投与群 1 例、60 mg/kg 投与群 2 例、300 mg/kg 投与群 3 例に小型化が観察された。そのほかの所見として、300 mg/kg 投与群の 1 匹に脾臓の腫大および他の 1 匹に副脾が、対照群 1 匹の乳腺に乳汁の貯留が観察された。

(2) 器官重量 (Table 21; Appendices 21-1~21-4)

300 mg/kg 投与群において、肝臓の重量が増加傾向を示し、比体重値は対照群と比較し

て有意 ($p < 0.05$) に増加した。脳、心臓、胸腺、腎臓、脾臓および副腎の重量および比体重値には、対照群と OSBP 各投与群との間に統計学的有意差は認められなかったが、300 mg/kg 投与群において副腎の重量および比体重値が低下傾向を示した。

(3) 病理組織学検査所見 (Table 22; Appendix 22)

各器官の観察所見を以下に示す。

(肝臓)

対照群 3 匹および 300 mg/kg 投与群 1 匹に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化が、対照群および 300 mg/kg 投与群各 2 匹に被膜下の限局性壊死が観察されたが、いずれも両群間に程度および頻度の差は認められなかった。また、雄の 300 mg/kg 投与群で観察された小葉中心性の肝細胞肥大の頻度の増加および脂肪化の程度の減少は、雌では明らかではなかった。そのほかに、肉眼的に尾状葉に異常がみられた対照群 1 匹では、同葉に広範囲な出血および壊死が観察され、多数の好中球が浸潤していた。

(腎臓)

対照群および 300 mg/kg 投与群各 6 匹の皮質に好塩基性尿細管が、対照群および 300 mg/kg 投与群各 1 匹に近位尿細管に空胞変性が、300 mg/kg 投与群 1 匹に間質にリンパ球の浸潤、他の 1 匹に限局性の線維化が観察されたが、いずれも両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

(脾臓)

対照群および 300 mg/kg 投与群の全例に褐色色素沈着および髄外造血が観察されたが、両群間に程度および頻度の差はなかった。また、300 mg/kg 投与群 1 匹に副脾が観察された。

(胸腺)

300 mg/kg 投与群 1 匹に萎縮が観察された。

(その他)

脳、心臓、副腎、膀胱および不妊例の卵巣に異常は観察されなかった。

Ⅱ. 生殖発生毒性

1. 生殖関連所見

1) 交配成績 (Table 23; Appendices 23-1~23-4)

すべての動物が交尾した。交尾はしたが不妊であった動物は、対照群の1組（動物番号：MX01005 × FB01005）および 300 mg/kg 投与群の2組（動物番号：MX04005 × FB04005、MX04010 × FB04010）に認められたが、受胎率には対照群と OSBP 各投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。また、同居から交尾までに要した日数およびその間の発情回数にも、対照群と OSBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 分娩および哺育状態

対照群を含むいずれの投与群においても分娩および哺育状態に異常は認められなかった。

3) 出産率および妊娠期間 (Table 24; Appendices 24-1~24-4)

出産率はすべての群で 100%を示した。いずれの妊娠動物も妊娠22~23日に出産し、妊娠期間には対照群と OSBP 各投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。

4) 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 24; Appendices 24-1~24-4)

黄体数、着床数および着床率には、対照群と OSBP 各投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。

2. 出生児所見

1) 生存性 (Table 24; Appendices 24-1~24-4)

産児数、分娩率、生存児数、生児出産率、性比、出生率および新生児生存率には、対照群と OSBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

死亡児は、60 mg/kg 投与群1匹、12 および 300 mg/kg 投与群各2匹に認められた。

2) 体重 (Table 25; Appendices 25-1~25-4)

雌雄とも、哺育0および4日の体重には、対照群と OSBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 形態 (Tables 26、27)

生存児では、哺育0日の外表検査において、300 mg/kg 投与群の産児1匹（母動物番号：FB04009）に鎖肛および無尾が観察された。この産児は、哺育4日の剖検時まで生存した。なお、12 mg/kg 投与群の死亡児1匹（母動物番号：FB02003）では、外表奇形として、全身浮腫、短軀、索状尾、鎖肛、内反足、無眼、四肢の減形成奇形が観察され、内臓奇形として、左腎臓および左副腎無発生、右側水腎、右側肺分葉異常、大血管転換が観察された。

【考 察】

一般状態の変化として、雌雄とも 300 mg/kg 投与群で、投与後に一過性の流涎、活動性の低下（自発運動の減少、腹臥位または横臥位、寄り掛かり姿勢）、半眼が観察され、さらに雌ではふらつき歩行も観察された。これらの変化は、OSBP の単回投与毒性試験および併合試験の予備試験においても認められていることから、OSBP 投与に起因した変化と考えられる。雄では、60 mg/kg 投与群においても投与期間初期に、少数例に一過性の流涎、自発運動の減少が観察されたことから、OSBP の 60 mg/kg の投与量も、ごく軽度ではあるが一般状態に影響を及ぼす可能性が考えられる。

剖検の結果、300 mg/kg 投与群では、雌雄ともに肝臓の比体重値が有意に増加した。肝臓の比体重値の増加は、併合試験の予備試験においても認められており、再現性のある変化であること、雄の肝臓の組織学検査においてもごく軽度ではあるが小葉中心性の肝細胞肥大が観察されていることから、肝臓の変化は OSBP 投与に起因したものと考えられる。雄について実施した血液生化学検査では、300 mg/kg 投与群において総コレステロール濃度が有意な高値を示したが、その程度は僅かであり、OSBP 投与との関連は明確ではなかった。また、同群では塩素濃度が有意な低値を示したが、腎臓の組織学検査において異常所見は認められなかったことから、偶発的な変化と考えられた。雄について実施した血液学検査では、300 mg/kg 投与群において、血色素量、ヘマトクリット値が有意に低下したが、生理的変動の範囲であり、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量に変化は認められず、さらに、脾臓の組織学検査においても毒性を示唆する変化は認められなかったことから、血色素量、ヘマトクリット値の低下は毒性学的意義に乏しい変化と考えられる。なお、肺の暗色点、肺門部の水腫が対照群を含む各投与群に、前胃粘膜に水腫様部位等の変化が 60 mg/kg 投与群に観察された。肺の変化は、OSBP のラットにおける単回経口投与毒性試験の 2000 mg/kg 投与群の死亡例に、胃の変化は、500 mg/kg 以上の投与群に認められているが、本試験において認められた肺および胃の変化は OSBP の用量に依存した変化ではなく、また、対照群にも認められている変化であることから OSBP 投与の影響とは考え難い。

300 mg/kg 投与群において雌の妊娠初期の摂餌量が有意に低下したが、妊娠後期には高値の傾向を示したことから、妊娠初期の摂餌量の有意な低下は偶発的な変化と考えられ、OSBP 投与の影響とは考え難い。雄には、OSBP 投与に起因したと考えられる摂餌量の変

化は認められなかった。雌雄ともに、体重推移には OSBP 投与による影響は認められなかった。したがって、雄の一般毒性学的無影響量は、300 mg/kg 投与群では一般状態および肝臓に影響を及ぼし、60 mg/kg 投与群においても、少数ではあるが、投与期間初期に活動性の低下が認められたことから 12 mg/kg/day と考えられる。ただし、60 mg/kg 投与群に対する影響はごく軽度と考えられる。一方、雌の一般毒性学的無影響量は、300 mg/kg 投与群において、肝臓の比体重値の増加および活動性の低下、半眼、ふらつき歩行等の一般状態の変化が認められたことから 60 mg/kg/day と考えられる。

雌雄動物の交尾率、受胎率には、OSBP 投与による影響は認められず、産児の生存性、発育にも OSBP 投与の影響は認められなかった。また、哺育 0 日の生存児の観察において、無尾および鎖肛が認められたが、この異常は、Crj:CD(SD) ラットでは自然発生的に観察される異常であり¹²⁾、発現頻度も低い (1/155 匹) ことから偶発的な変化と考えられる。したがって、生殖発生毒性学的無影響量は、雌雄および産児ともに 300 mg/kg/day と考えられる。

以上の試験成績から、本試験条件下では、OSBP の反復投与毒性に関する無影響量は、雄では 12 mg/kg/day、雌では 60 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、雌雄および産児ともに 300 mg/kg/day であると判断される。

【文 献】

- 1) NIOSH. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, Vol. 3, 1981-82, and Cumulative Supplement to the 1981-82 Edition, 1983-84.
- 2) Journal of Medicinal Chemistry. Vol. 18: 868 (1975)
- 3) Journal of Medicinal Chemistry. Vol. 23: 1350 (1980)
- 4) Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 5th ed., Cincinnati, OH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists, INC., Vol. 5: 84 (1986)
- 5) 化学物質点検推進連絡協議会, 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、Vol. 4: 281-299 (1996)
- 6) 丹後俊郎: 「医学への統計学 (古川俊之 監修)」, 朝倉書店. 東京 (1985)
- 7) 石居 進: 「生物統計学入門」, 培風館. 東京 (1992)
- 8) 佐久間昭: 「薬効評価一計画と解析」, 東京大学出版会. 東京 (1977)
- 9) Dunnett, C. W. : New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491 (1964)
- 10) Scheffé, H. : A method for judging all contrasts in the analysis of variance. Biometrika. 40: 87-104 (1953)
- 11) Kruskal, W. H., Wallis, W. A. : Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Assoc. 47: 583-621 (1952)

- 12) Nakatsuka T., Horimoto M., Ito M., Matsubara y., Akaike M. and Ariyuki F.:
Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA) Survey on Background
Control Data of Developmental and Reproductive Toxicity Studies in Rats,
Rabbits and Mice. Cong. Anom., 37: 47-138 (1997)

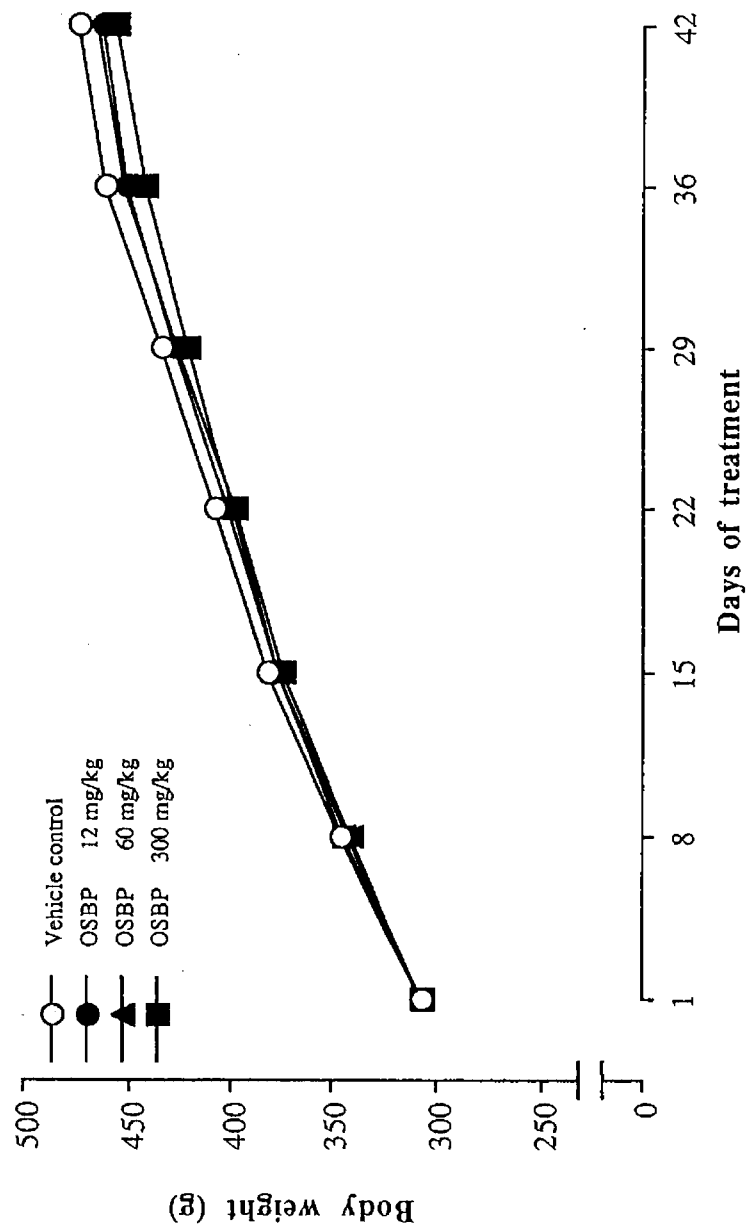


Fig. 1 Body weight of males

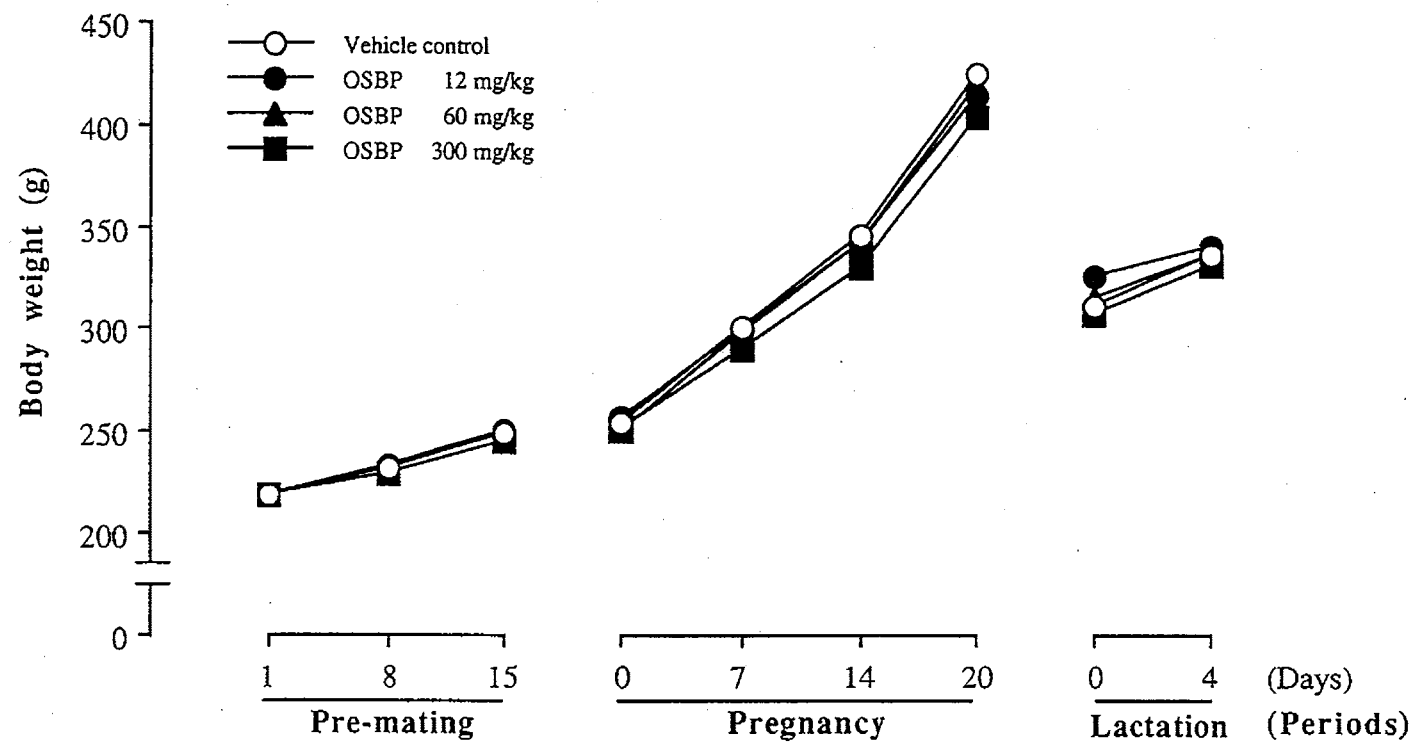


Fig. 2 Body weight of females

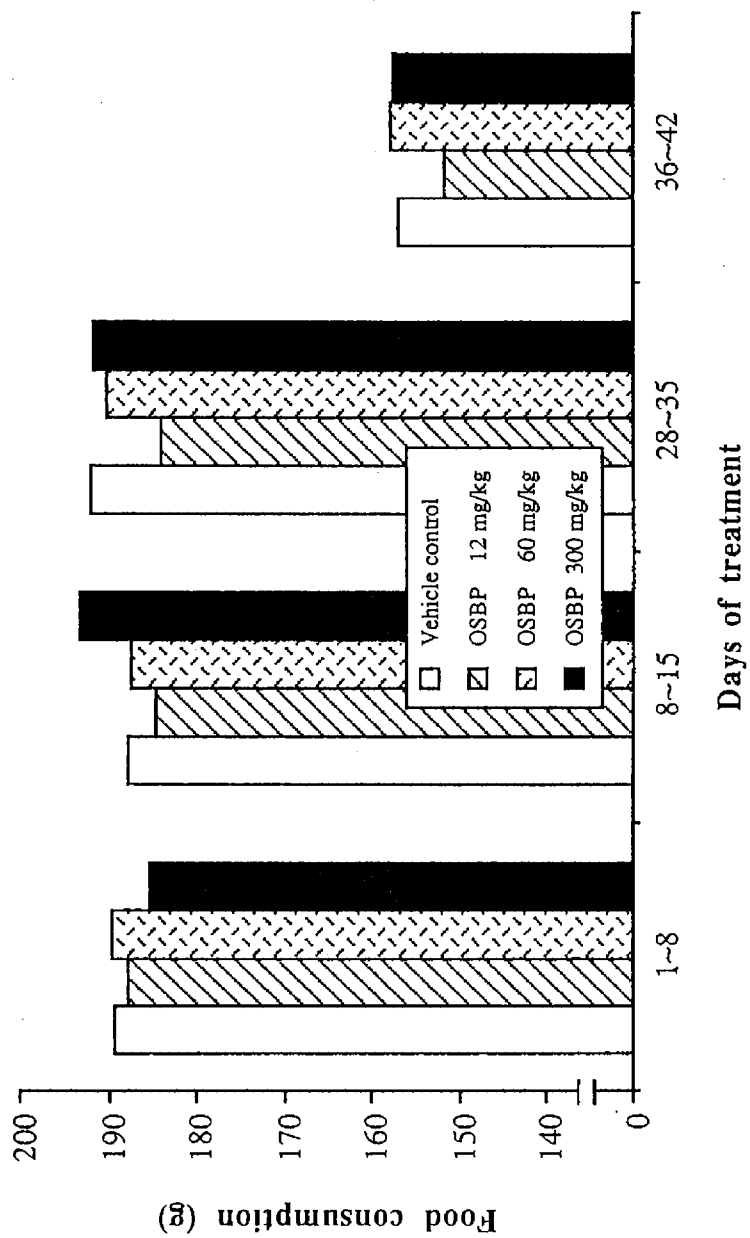


Fig. 3 Food consumption of males

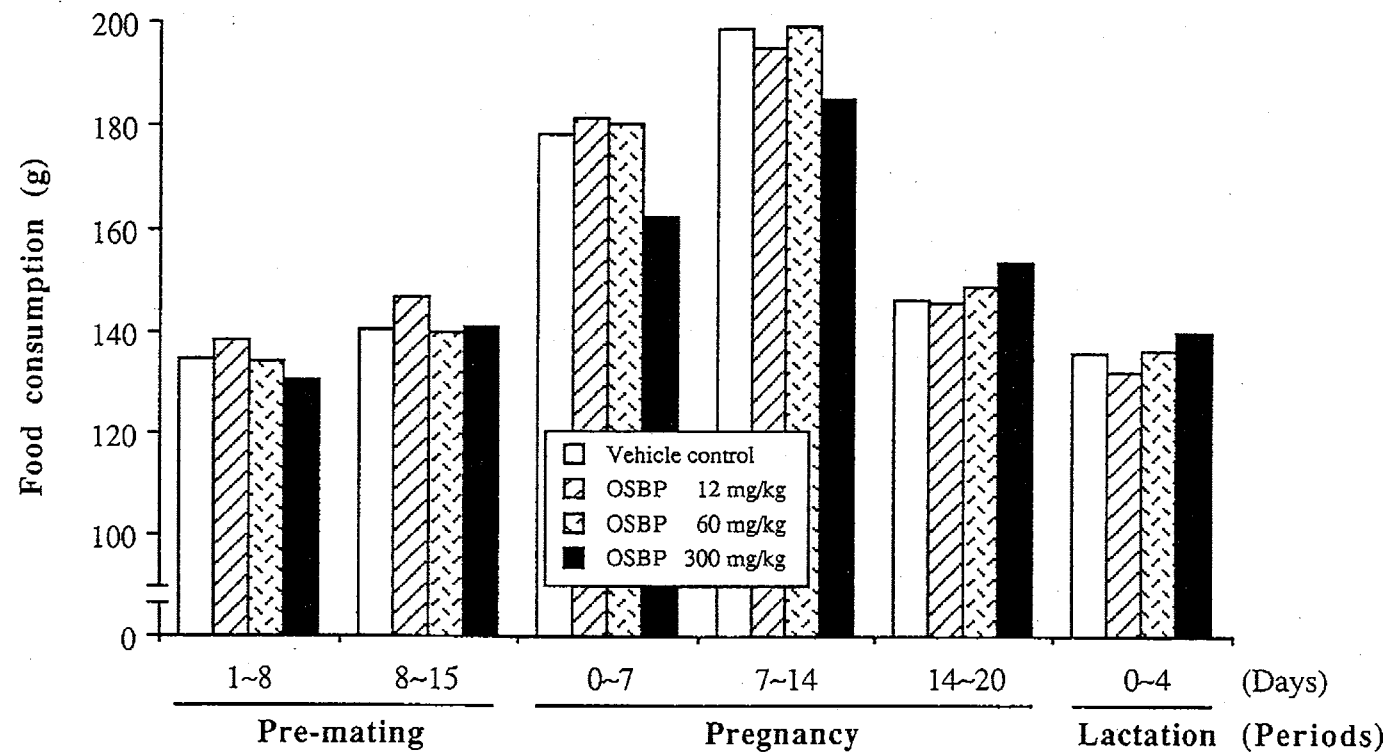


Fig. 4 Food consumption of females

【TABLE INDEX】

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

Table no.	(appendix no.)	Table title
1	(1-1 ~ 1-4)	Clinical signs of F ₀ males
2	(2-1 ~ 2-4)	Clinical signs of F ₀ females
3	(3-1 ~ 3-4)	Body weight of F ₀ males
4	(4-1 ~ 4-4)	Body weight gain of F ₀ males
5	(5-1 ~ 5-4)	Body weight of F ₀ females during pre mating period
6	(6-1 ~ 6-4)	Body weight gain of F ₀ females during pre mating period
7	(7-1 ~ 7-4)	Body weight of F ₀ females during pregnancy period
8	(8-1 ~ 8-4)	Body weight gain of F ₀ females during pregnancy period
9	(9-1 ~ 9-4)	Body weight of F ₀ females during lactation period
10	(10-1 ~10-4)	Body weight gain of F ₀ females during lactation period
11	(11-1 ~11-4)	Food consumption of F ₀ males
12	(12-1 ~12-4)	Food consumption of F ₀ females during pre mating period
13	(13-1 ~13-4)	Food consumption of F ₀ females during pregnancy period
14	(14-1 ~14-4)	Food consumption of F ₀ females during lactation period
15	(15-1 ~15-4)	Hematological findings of F ₀ males after oral administration for 42 days
16	(16-1 ~16-4)	Biochemical findings of F ₀ males after oral administration for 42 days
17	(17)	Summary of macroscopic findings in F ₀ males
18	(18-1 ~18-4)	Absolute and relative organ weight of F ₀ males after oral administration for 42 days
19	(19)	Summary of histopathological findings in F ₀ males
20	(20)	Summary of macroscopic findings in F ₀ females
21	(21-1 ~21-4)	Absolute and relative organ weight of F ₀ females on day 4 of lactation

- 22 (22) Summary of histopathological findings in F₀ females
- 23 (23-1 ~23-4) Reproductive performance of F₀ animals
- 24 (24-1 ~24-4) Development of F₁ pups up to day 4 of lactation
- 25 (25-1 ~25-4) Body weight of F₁ pups up to day 4 of lactation
- 26 Morphological findings in F₁ pups on day 4 of lactation
- 27 Morphological findings in F₁ dead pups

Table 1

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

Clinical signs of F₀ males

Clinical signs	Group	No. of animals examined	No. of animals showing clinical signs							Total
			1~7 ^{a)}	8~14	15~21	22~28	29~35	36~42	43	
Salivation after dosing	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	1	0	0	0	0	0	1
	300 mg/kg	13	13	13	13	13	13	13	0	13
Decrease in locomotor activity	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	2	0	0	0	0	0	0	2
	300 mg/kg	13	11	12	13	11	11	10	0	13
Prone or lateral position	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	9	0	0	0	0	0	0	9

a): days of treatment

b): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 1 (continued)

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

Clinical signs of F₀ males

Clinical signs	Group	No. of animals examined	No. of animals showing clinical signs							Total
			1~7 ^{a)}	8~14	15~21	22~28	29~35	36~42	43	
Incomplete eyelid opening	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	2	0	0	0	0	0	0	2
Leaning	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	1	0	0	0	0	0	0	1

a): days of treatment

b): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 2

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

Clinical signs of F₀ females

Clinical signs	Group	No. of animals examined	No. of animals showing clinical signs							Total
			1~7 ^{a)}	8~14	15~21	22~28	29~35	36~42	43~	
Salivation after dosing	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	10	13	13	13	13	12	3	13
Decrease in locomotor activity	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	13	13	13	13	13	12	6	13
Prone or lateral position	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	10	10	11	10	7	11	5	13

a): days of treatment

b): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 2 (continued)

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

Clinical signs of F₀ females

Clinical signs	Group	No. of animals examined	No. of animals showing clinical signs							Total
			1~7 ^{a)}	8~14	15~21	22~28	29~35	36~42	43~	
Ataxic gait	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	3	3	2	2	3	1	0	10
Incomplete eyelid opening	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	6	2	3	4	0	0	0	7
Leaning	0 mg/kg ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	2	1	0	1	0	0	0	3

a): days of treatment

b): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 3

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

Body weight of F₀ males (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
Days of treatment				
1 (Initial weight)	306.2 $\pm$ 6.0 (13)	306.4 $\pm$ 6.5 (13)	306.5 $\pm$ 6.7 (13)	306.3 $\pm$ 6.6 (13)
8	345.5 $\pm$ 11.7 (13)	342.0 $\pm$ 12.6 (13)	340.5 $\pm$ 12.9 (13)	343.8 $\pm$ 10.8 (13)
15	382.1 $\pm$ 16.9 (13)	376.2 $\pm$ 21.5 (13)	373.8 $\pm$ 20.9 (13)	376.5 $\pm$ 18.2 (13)
22	407.3 $\pm$ 20.2 (13)	401.2 $\pm$ 24.8 (13)	397.3 $\pm$ 22.3 (13)	398.3 $\pm$ 19.8 (13)
29	434.2 $\pm$ 22.9 (13)	427.3 $\pm$ 30.5 (13)	425.8 $\pm$ 25.7 (13)	421.4 $\pm$ 25.9 (13)
36	461.4 $\pm$ 25.4 (13)	450.5 $\pm$ 35.5 (13)	451.8 $\pm$ 32.6 (13)	442.2 $\pm$ 33.6 (13)
42	474.5 $\pm$ 27.3 (13)	462.4 $\pm$ 41.0 (13)	464.3 $\pm$ 32.3 (13)	455.7 $\pm$ 37.6 (13)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 4

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

Body weight gain of F₀ males (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
Days of treatment				
1~ 8	39.3 $\pm$ 8.5 (13)	35.5 $\pm$ 7.4 (13)	34.0 $\pm$ 10.7 (13)	37.5 $\pm$ 7.1 (13)
8~ 15	36.6 $\pm$ 6.2 (13)	34.2 $\pm$ 10.6 (13)	33.2 $\pm$ 11.4 (13)	32.7 $\pm$ 9.8 (13)
15~ 22	25.2 $\pm$ 5.9 (13)	25.0 $\pm$ 7.1 (13)	23.6 $\pm$ 5.4 (13)	21.7 $\pm$ 5.6 (13)
22~ 29	26.9 $\pm$ 5.4 (13)	26.1 $\pm$ 7.9 (13)	28.5 $\pm$ 7.1 (13)	23.2 $\pm$ 8.5 (13)
29~ 36	27.2 $\pm$ 8.0 (13)	23.2 $\pm$ 7.4 (13)	26.0 $\pm$ 8.8 (13)	20.7 $\pm$ 11.7 (13)
36~ 42	13.1 $\pm$ 12.3 (13)	11.9 $\pm$ 8.3 (13)	12.5 $\pm$ 6.2 (13)	13.5 $\pm$ 7.1 (13)

1~ 15	75.9 $\pm$ 13.6 (13)	69.8 $\pm$ 16.5 (13)	67.2 $\pm$ 19.8 (13)	70.3 $\pm$ 15.4 (13)
1~ 22	101.0 $\pm$ 16.8 (13)	94.7 $\pm$ 20.1 (13)	90.8 $\pm$ 21.9 (13)	92.0 $\pm$ 17.2 (13)
1~ 29	128.0 $\pm$ 20.0 (13)	120.9 $\pm$ 26.1 (13)	119.3 $\pm$ 24.9 (13)	115.2 $\pm$ 23.6 (13)
1~ 36	155.2 $\pm$ 21.9 (13)	144.0 $\pm$ 31.6 (13)	145.3 $\pm$ 31.1 (13)	135.9 $\pm$ 32.3 (13)
1~ 42	168.3 $\pm$ 24.8 (13)	155.9 $\pm$ 37.5 (13)	157.8 $\pm$ 31.1 (13)	149.4 $\pm$ 36.3 (13)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 5

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

Body weight of F₀ females during premating period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 (Initial weight)	219.1 $\pm$ 7.5 (13)	219.3 $\pm$ 7.5 (13)	219.0 $\pm$ 7.7 (13)	219.3 $\pm$ 7.7 (13)
8	231.6 $\pm$ 9.1 (13)	233.3 $\pm$ 14.0 (13)	229.5 $\pm$ 12.0 (13)	229.0 $\pm$ 10.3 (13)
15	249.0 $\pm$ 9.3 (13)	250.6 $\pm$ 17.0 (13)	245.8 $\pm$ 14.9 (13)	244.7 $\pm$ 17.7 (13)
22				296.8 (1)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 6

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

Body weight gain of F₀ females during premating period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	OSBP			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	12	60	300
Days of treatment				
1~ 8	12.5 $\pm$ 7.3 (13)	13.9 $\pm$ 8.8 (13)	10.5 $\pm$ 8.6 (13)	9.7 $\pm$ 6.9 (13)
8~ 15	17.4 $\pm$ 8.8 (13)	17.3 $\pm$ 5.6 (13)	16.3 $\pm$ 9.3 (13)	15.8 $\pm$ 11.9 (13)
15~ 22				7.1 (1)
1~ 15	29.9 $\pm$ 6.0 (13)	31.3 $\pm$ 12.0 (13)	26.7 $\pm$ 10.9 (13)	25.4 $\pm$ 14.1 (13)
1~ 22				66.8 (1)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 7

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

Body weight of F₁ females during pregnancy period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
Days of pregnancy				
0	254.2 $\pm$ 8.9 (12)	256.6 $\pm$ 18.2 (13)	250.1 $\pm$ 10.8 (13)	251.2 $\pm$ 20.1 (11)
7	300.3 $\pm$ 7.7 (12)	299.3 $\pm$ 19.5 (13)	298.2 $\pm$ 17.0 (13)	289.9 $\pm$ 22.2 (11)
14	346.1 $\pm$ 13.1 (12)	341.4 $\pm$ 24.2 (13)	341.3 $\pm$ 19.9 (13)	330.2 $\pm$ 23.0 (11)
20	425.3 $\pm$ 21.6 (12)	414.5 $\pm$ 27.8 (13)	420.2 $\pm$ 22.3 (13)	404.3 $\pm$ 26.6 (11)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 8

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

Body weight gain of F₁ females during pregnancy period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
Dose group (mg/kg)				
Days of pregnancy				
0~ 7	46.2 $\pm$ 9.4 (12)	42.7 $\pm$ 7.4 (13)	48.1 $\pm$ 9.4 (13)	38.7 $\pm$ 6.0 (11)
7~ 14	45.7 $\pm$ 8.4 (12)	42.1 $\pm$ 7.0 (13)	43.1 $\pm$ 6.1 (13)	40.3 $\pm$ 5.3 (11)
14~ 20	79.3 $\pm$ 12.4 (12)	73.1 $\pm$ 13.6 (13)	78.9 $\pm$ 9.0 (13)	74.1 $\pm$ 8.4 (11)
0~ 14	91.9 $\pm$ 16.3 (12)	84.8 $\pm$ 12.7 (13)	91.3 $\pm$ 13.2 (13)	79.0 $\pm$ 10.0 (11)
0~ 20	171.2 $\pm$ 23.2 (12)	158.0 $\pm$ 21.1 (13)	170.2 $\pm$ 18.0 (13)	153.2 $\pm$ 13.7 (11)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 9

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

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

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
Days of lactation				
0	311.5 $\pm$ 20.5 (12)	325.2 $\pm$ 25.3 (13)	315.7 $\pm$ 33.1 (13)	307.8 $\pm$ 23.9 (11)
4	335.7 $\pm$ 16.6 (12)	339.7 $\pm$ 25.9 (13)	336.7 $\pm$ 20.7 (13)	331.7 $\pm$ 24.5 (11)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 10

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

Body weight gain of F₁ females during lactation period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	OSBP			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	12	60	300
Days of lactation				
0~ 4	24.3 ± 15.0 (12)	14.5 ± 13.1 (13)	21.0 ± 19.0 (13)	23.9 ± 14.7 (11)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 11

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

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

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1~ 8	189.3 $\pm$ 12.7 (13)	187.6 $\pm$ 10.3 (13)	189.6 $\pm$ 12.0 (13)	185.4 $\pm$ 9.0 (13)
8~ 15	187.8 $\pm$ 13.8 (13)	184.5 $\pm$ 18.5 (13)	187.4 $\pm$ 18.8 (13)	193.2 $\pm$ 11.5 (13)
29~ 36	192.0 $\pm$ 17.9 (13)	183.9 $\pm$ 22.2 (13)	190.2 $\pm$ 16.0 (13)	191.8 $\pm$ 18.2 (13)
36~ 42	157.0 $\pm$ 16.2 (13)	151.7 $\pm$ 18.7 (13)	158.0 $\pm$ 15.8 (13)	157.7 $\pm$ 16.7 (13)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 12

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

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

Compound	OSBP				
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	12	60	/	300
Days of treatment					
1~ 8	135.0 ± 11.8 (13)	138.6 ± 13.6 (13)	134.1 ± 10.7 (13)		130.3 ± 9.9 (13)
8~ 15	140.4 ± 16.8 (13)	147.1 ± 12.3 (13)	139.8 ± 17.9 (13)		141.2 ± 14.5 (13)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 13

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

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

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
Dose group (mg/kg)				
Days of pregnancy				
0~ 7	178.5 $\pm$ 12.9 (12)	181.8 $\pm$ 12.2 (13)	180.5 $\pm$ 15.7 (13)	162.5 $\pm$ 16.2* (11)
7~ 14	199.1 $\pm$ 14.0 (12)	195.2 $\pm$ 18.0 (13)	199.7 $\pm$ 20.9 (13)	185.4 $\pm$ 20.0 (11)
14~ 20	146.2 $\pm$ 14.3 (12)	145.9 $\pm$ 16.3 (13)	148.8 $\pm$ 14.3 (13)	153.7 $\pm$ 31.4 (11)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

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

Table 14

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

Food consumption of F₀ females during lactation period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	OSBP			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	12	60	300
Days of lactation				
0~ 4	135.9 ± 16.0 (12)	132.1 ± 20.9 (13)	136.5 ± 22.4 (13)	140.2 ± 20.5 (11)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 15

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

Hematological findings of Fo males after oral administration for 42 days

OSBP (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)
0	(13) 826 ± 24	(13) 15.5 ± 0.4	(13) 46.1 ± 1.2	(13) 55.9 ± 1.9	(13) 18.8 ± 0.5	(13) 33.7 ± 0.5	(13) 91.7 ± 10.3
12	(13) 828 ± 43	(13) 15.3 ± 0.7	(13) 45.7 ± 2.2	(13) 55.2 ± 1.5	(13) 18.5 ± 0.6	(13) 33.6 ± 0.3	(13) 97.0 ± 9.0
60	(13) 827 ± 33	(13) 15.5 ± 0.4	(13) 46.1 ± 1.2	(13) 55.8 ± 2.1	(13) 18.7 ± 0.6	(13) 33.6 ± 0.4	(13) 94.9 ± 7.7
300	(13) 812 ± 41	(13) 14.9** ± 0.5	(13) 44.4* ± 1.3	(13) 54.8 ± 1.9	(13) 18.4 ± 0.8	(13) 33.6 ± 0.3	(13) 91.3 ± 5.6

OSBP (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(13) 60 ± 15	(13) 0 ± 0	(13) 18 ± 13	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 1 ± 1	(13) 80 ± 14
12	(13) 59 ± 18	(13) 0 ± 0	(13) 14 ± 5	(13) 0 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 0 ± 0	(13) 85 ± 5
60	(13) 60 ± 24	(13) 0 ± 0	(13) 15 ± 8	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 1 ± 1	(13) 83 ± 9
300	(13) 55 ± 12	(13) 1 ± 2	(13) 16 ± 11	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 1 ± 1	(13) 81 ± 12

Parameter, mean S.D.
(), number of animals

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

Table 16

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

Biochemical findings of Fo males after oral administration for 42 days

OSBP (mg/kg)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Tri- glyceride (mg/dl)	Total bilirubin (mg/dl)
0	(13) 5.2 ±0.1	(13) 3.0 ±0.1	(13) 1.31 ±0.11	(13) 17 ±3	(13) 0.6 ±0.1	(13) 142 ±18	(13) 37 ±8	(13) 32 ±9	(13) 0.08 ±0.03
12	(13) 5.4 ±0.2	(13) 2.9 ±0.2	(13) 1.19* ±0.11	(13) 19 ±4	(13) 0.7 ±0.1	(13) 132 ±17	(13) 36 ±6	(13) 31 ±11	(13) 0.10 ±0.02
60	(13) 5.3 ±0.2	(13) 2.9 ±0.1	(13) 1.23 ±0.09	(13) 18 ±3	(13) 0.7 ±0.1	(13) 139 ±12	(13) 36 ±7	(13) 33 ±10	(13) 0.09 ±0.02
300	(13) 5.4 ±0.3	(13) 3.0 ±0.2	(13) 1.30 ±0.11	(13) 19 ±3	(13) 0.6 ±0.1	(13) 136 ±11	(13) 45* ±11	(13) 33 ±7	(13) 0.09 ±0.03

OSBP (mg/kg)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	Ca (mg/dl)	Inorg. Phos. (mg/dl)	ALP (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	γ-GTP (U/l)
0	(13) 145.2 ±0.9	(13) 4.01 ±0.28	(13) 109.3 ±1.0	(13) 8.6 ±0.2	(13) 6.5 ±0.6	(13) 238 ±49	(13) 34 ±6	(13) 76 ±20	(13) 0 ±0
12	(13) 145.5 ±0.8	(13) 3.93 ±0.37	(13) 109.2 ±1.5	(13) 8.7 ±0.2	(13) 6.2 ±0.6	(13) 261 ±61	(13) 33 ±6	(13) 69 ±9	(13) 0 ±1
60	(13) 145.4 ±1.1	(13) 3.94 ±0.29	(13) 108.9 ±1.3	(13) 8.6 ±0.2	(13) 6.2 ±0.5	(13) 274 ±38	(13) 33 ±5	(13) 67 ±10	(13) 0 ±0
300	(13) 144.9 ±1.1	(13) 4.00 ±0.33	(13) 107.5** ±1.1	(13) 8.6 ±0.2	(13) 6.2 ±0.6	(13) 224 ±42	(13) 35 ±3	(13) 70 ±6	(13) 0 ±0

Parameter, mean S.D.
(), number of animals

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

Table 17
OSBP: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of macroscopic findings in Fo males

Group Grade	Control		12 mg/kg		60 mg/kg		300 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, white/pale	12	1	12	1	13	0	11	2
Diaphragmatic nodule	13	0	13	0	13	0	12	1
Yellow	11	2	12	1	12	1	13	0
Accentuated lobular pattern	10	3	13	0	12	1	13	0
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Recessed area, cortex, right side	13	0	13	0	12	1	11	2
Spot/area, pale, cortex	12	1	13	0	13	0	12	1
Dilatation, renal pelvis, left side	13	0	13	0	12	1	13	0
Cyst, cortico-medullary junction, right side	13	0	13	0	12	1	13	0
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, dark	12	1	11	2	13	0	13	0
Area, edematous, hilum, right side	13	0	13	0	12	1	13	0
(Forestomach)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Area, edematous, mucosa	13	0	13	0	12	1	13	0
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Accessory spleen	13	0	11	2	13	0	13	0
(Testis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small	12	1	13	0	13	0	13	0
(Skin)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Soiled, perineal region	13	0	13	0	13	0	12	1

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

Table 18

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

Absolute and relative organ weight of F₀ males after oral administration for 42 days; mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		OSBP			
Dose group (mg/kg)		0 ^{a)}	12	60	300
Terminal body weight	(g)	445.9 $\pm$ 26.0 (13)	434.9 $\pm$ 36.5 (13)	437.9 $\pm$ 29.0 (13)	426.6 $\pm$ 33.1 (13)
Brain	(g)	2.04 $\pm$ 0.08 ^{b)} 0.46 $\pm$ 0.03 ^{c)} (13)	2.02 $\pm$ 0.09 (13) 0.47 $\pm$ 0.04	2.00 $\pm$ 0.06 (13) 0.46 $\pm$ 0.03	2.00 $\pm$ 0.08 (13) 0.47 $\pm$ 0.04
Heart	(g)	1.29 $\pm$ 0.08 (13) 0.29 $\pm$ 0.02	1.25 $\pm$ 0.15 (13) 0.29 $\pm$ 0.02	1.30 $\pm$ 0.12 (13) 0.30 $\pm$ 0.02	1.21 $\pm$ 0.13 (13) 0.28 $\pm$ 0.02
Thymus	(mg)	333.1 $\pm$ 65.3 (13) 74.8 $\pm$ 14.8	362.6 $\pm$ 89.1 (13) 83.3 $\pm$ 19.7	350.3 $\pm$ 91.2 (13) 80.1 $\pm$ 20.0	322.3 $\pm$ 75.1 (13) 76.0 $\pm$ 19.3
Liver	(g)	12.03 $\pm$ 1.21 (13) 2.70 $\pm$ 0.19	11.74 $\pm$ 1.50 (13) 2.69 $\pm$ 0.17	12.21 $\pm$ 1.34 (13) 2.78 $\pm$ 0.16	12.37 $\pm$ 0.99 (13) 2.91 $\pm$ 0.19*
Kidneys	(g)	3.03 $\pm$ 0.32 (13) 0.68 $\pm$ 0.07	3.03 $\pm$ 0.24 (13) 0.70 $\pm$ 0.05	3.01 $\pm$ 0.23 (13) 0.69 $\pm$ 0.04	3.16 $\pm$ 0.21 (13) 0.74 $\pm$ 0.07
Spleen	(g)	0.74 $\pm$ 0.09 (13) 0.17 $\pm$ 0.02	0.79 $\pm$ 0.09 (13) 0.18 $\pm$ 0.02	0.78 $\pm$ 0.08 (13) 0.18 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.06 (13) 0.17 $\pm$ 0.02
Adrenal glands	(mg)	58.1 $\pm$ 10.6 (12) 13.2 $\pm$ 2.4	55.3 $\pm$ 10.1 (13) 12.7 $\pm$ 1.9	51.8 $\pm$ 10.3 (13) 11.8 $\pm$ 2.1	47.6 $\pm$ 8.8 (13) 11.1 $\pm$ 1.6
Testes	(g)	3.12 $\pm$ 0.60 (13) 0.70 $\pm$ 0.14	3.13 $\pm$ 0.29 (13) 0.72 $\pm$ 0.06	3.03 $\pm$ 0.17 (13) 0.69 $\pm$ 0.06	3.16 $\pm$ 0.21 (13) 0.75 $\pm$ 0.07
Epididymides	(g)	1.16 $\pm$ 0.17 (13) 0.26 $\pm$ 0.04	1.17 $\pm$ 0.12 (13) 0.27 $\pm$ 0.03	1.15 $\pm$ 0.13 (13) 0.26 $\pm$ 0.02	1.14 $\pm$ 0.10 (13) 0.27 $\pm$ 0.03

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

b): absolute weight

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

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

Table 19

OSBP: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of histopathological findings in Fo male

Group	Control						12 mg/kg						60 mg/kg						300 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(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	7	6	0	0	0	6##
Fatty change, periportal	0	3	6	4	0	13	0	0	9	3	1	13	0	3	8	2	0	13	0	9	4	0	0*	13
Microgranuloma	8	5	0	0	0	5	8	2	3	0	0	5	11	2	0	0	0	2	11	2	0	0	0	2
Necrosis, focal	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	11	0	2	0	0	2	12	1	0	0	0	1
Hemorrhage, focal	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0
Fibrosis, capsule, focal	13	0	0	0	0	0	11	1	1	0	0	2	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1
Degeneration, fatty, hepatocyte, focal	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Granulation tissue, capsule, focal	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1
(Heart)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Myocardial degeneration	13	0	0	0	0	0	11	2	0	0	0	2	10	2	1	0	0	3	11	2	0	0	0	2
(Kidney)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Eosinophilic body	9	3	1	0	0	4													9	3	1	0	0	4
Basophilic tubule, cortex	3	9	1	0	0	10													2	8	3	0	0	11
Cyst, tubule, cortico-medullary junction	13	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	12	1	0	0	0	1													11	2	0	0	0	2
Cast, cortex	13	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
(Spleen)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	6	7	0	0	13													0	6	6	1	0	13
Deposit, pigment, brown	0	0	11	2	0	13													0	1	11	1	0	13
(Testis)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Atrophy, seminiferous tubule	9	3	0	1	0	4													10	3	0	0	0	3
Giant cell, multinucleated, seminiferous tubule	12	0	0	1	0	1													13	0	0	0	0	0
Decrease, germ cell, seminiferous tubule	12	0	0	1	0	1													13	0	0	0	0	0
(Epididymis)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Cell debris, lumen	12	0	0	0	1	1													13	0	0	0	0	0
Decrease, sperm, lumen	12	0	0	0	1	1													13	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	12	1	0	0	0	1													11	2	0	0	0	2
(Urinary bladder)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria	13	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
(Brain)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Thymus)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								

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

[], Number of animals examined

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

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

Table 20
OSBP: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of macroscopic findings in Fo females

Group Grade	Control		12 mg/kg		60 mg/kg		300 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Brain)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Dilatation, lateral ventricle, left side	13	0	13	0	12	1	13	0
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	13	0	12	1
Pale	13	0	13	0	13	0	12	1
Spot, pale	13	0	12	1	13	0	13	0
Spot, white, multiple, caudate lobe	12	1	13	0	13	0	13	0
Dark, caudate lobe	12	1	13	0	13	0	13	0
Hard, caudate lobe	12	1	13	0	13	0	13	0
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Pale	13	0	13	0	13	0	10	3
Dilatation, renal pelvis, right side	13	0	13	0	12	1	13	0
Cyst, cortico-medullary junction	13	0	12	1	13	0	13	0
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, dark	12	1	12	1	13	0	12	1
(Glandular stomach)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Area, yellow, mucosa	12	1	13	0	12	1	13	0
Spot, red, multiple, mucosa	13	0	13	0	12	1	13	0
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small	13	0	12	1	11	2	10	3
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	13	0	12	1
Accessory spleen	13	0	13	0	13	0	12	1
(Mammary gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Retention, milk	12	1	13	0	13	0	13	0

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

Table 21

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

Absolute and relative organ weight of F₀ females on day 4 of lactation; mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		OSBP			
Dose group (mg/kg)		0 ^{a)}	12	60	300
Terminal body weight	(g)	335.7 $\pm$ 16.6 (12)	339.7 $\pm$ 25.9 (13)	336.7 $\pm$ 20.7 (13)	331.7 $\pm$ 24.5 (11)
Brain	(g)	1.94 $\pm$ 0.06 ^{b)} 0.58 $\pm$ 0.02 ^{c)} (12)	1.90 $\pm$ 0.10 (13) 0.56 $\pm$ 0.04	1.90 $\pm$ 0.08 (13) 0.57 $\pm$ 0.05	1.92 $\pm$ 0.05 (11) 0.58 $\pm$ 0.05
Heart	(g)	1.02 $\pm$ 0.05 (12) 0.31 $\pm$ 0.02	0.99 $\pm$ 0.10 (13) 0.29 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.09 (13) 0.29 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.08 (11) 0.29 $\pm$ 0.02
Thymus	(mg)	249.4 $\pm$ 79.7 (12) 74.3 $\pm$ 22.7	244.8 $\pm$ 60.6 (13) 71.8 $\pm$ 15.9	231.0 $\pm$ 90.2 (13) 68.1 $\pm$ 25.3	212.0 $\pm$ 90.0 (11) 63.2 $\pm$ 24.8
Liver	(g)	13.58 $\pm$ 0.83 (12) 4.05 $\pm$ 0.29	13.52 $\pm$ 1.64 (13) 3.98 $\pm$ 0.28	13.95 $\pm$ 1.29 (13) 4.15 $\pm$ 0.34	14.52 $\pm$ 1.63 (11) 4.37 $\pm$ 0.30*
Kidneys	(g)	2.09 $\pm$ 0.16 (12) 0.63 $\pm$ 0.06	2.01 $\pm$ 0.21 (13) 0.59 $\pm$ 0.04	2.04 $\pm$ 0.17 (13) 0.61 $\pm$ 0.06	2.12 $\pm$ 0.17 (11) 0.64 $\pm$ 0.05
Spleen	(g)	0.74 $\pm$ 0.09 (12) 0.22 $\pm$ 0.03	0.76 $\pm$ 0.11 (13) 0.22 $\pm$ 0.03	0.71 $\pm$ 0.09 (13) 0.21 $\pm$ 0.02	0.74 $\pm$ 0.14 (11) 0.22 $\pm$ 0.04
Adrenal glands	(mg)	80.3 $\pm$ 6.5 (12) 24.0 $\pm$ 2.7	80.4 $\pm$ 16.3 (13) 23.6 $\pm$ 4.1	82.8 $\pm$ 13.7 (13) 24.6 $\pm$ 3.7	72.3 $\pm$ 13.4 (11) 21.8 $\pm$ 3.8

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

b): absolute weight

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

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

Table 22

OSBP: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of histopathological findings in Fo female

Group Grade	Control						12 mg/kg						60 mg/kg						300 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Fatty change, periportal	10	3	0	0	0	3													12	1	0	0	0	1
Necrosis, focal, subcapsular area	11	0	2	0	0	2													11	1	1	0	0	2
Necrosis and hemorrhage, caudate lobe	12	0	0	0	1	1													13	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, neutrophil, caudate lobe	12	0	0	1	0	1													13	0	0	0	0	0
(Kidney)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Basophilic tubule, cortex	7	6	0	0	0	6													7	6	0	0	0	6
Vacuolar degeneration, proximal tubule	12	0	1	0	0	1													12	0	1	0	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	13	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
Fibrosis, focal	13	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
(Spleen)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	0	13	0	0	13													0	1	12	0	0	13
Deposit, pigment, brown	0	2	11	0	0	13													0	1	12	0	0	13
Accessory spleen	13	0	0	0	0	0													12	0	1	0	0	1
(Thymus)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Atrophy	13	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
(Brain)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Heart)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Urinary bladder)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Ovary)	[1]						[0]						[0]						[2]					
No remarkable change																								

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

[], Number of animals examined

Table 23

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

Reproductive performance of F₀ animals

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
Dose group (mg/kg)				
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index	100	100	100	100
Number of pregnant animals	12	13	13	11
Fertility index	92.3	100	100	84.6
Pairing days until copulation Mean ± S.D. (N)	2.5 ± 1.1 (13)	2.0 ± 1.0 (13)	2.4 ± 1.7 (13)	2.8 ± 2.0 (13)
Frequency of vaginal estrus Mean ± S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (13)	1.0 ± 0.0 (13)	1.1 ± 0.3 (13)	1.0 ± 0.0 (13)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

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

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

Table 24

OSBP: combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test in rats

Development of F₁ pups up to day 4 of lactation; mean $\pm$ S.D. (N)

Compound Dose group (mg/kg)	DTP			
	0 a)	12	60	300
Number of pregnant females	12	13	13	11
Number of females with live pups	12	13	13	11
Gestation index	100	100	100	100
Gestation length in days	22.3 $\pm$ 0.5 (12)	22.2 $\pm$ 0.4 (13)	22.2 $\pm$ 0.4 (13)	22.5 $\pm$ 0.5 (11)
Number of corpora lutea	17.2 $\pm$ 1.4 (12)	15.9 $\pm$ 2.1 (13)	17.1 $\pm$ 1.7 (13)	16.8 $\pm$ 1.7 (11)
Number of implantation sites	16.0 $\pm$ 1.7 (12)	14.7 $\pm$ 3.2 (13)	16.3 $\pm$ 1.8 (13)	15.5 $\pm$ 2.7 (11)
Implantation index	93.3 $\pm$ 7.4 (12)	91.4 $\pm$ 13.7 (13)	95.6 $\pm$ 5.5 (13)	91.9 $\pm$ 8.7 (11)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	15.1 $\pm$ 2.4 (12)	13.8 $\pm$ 2.8 (13)	15.4 $\pm$ 1.7 (13)	14.3 $\pm$ 2.2 (11)
Delivery index	93.9 $\pm$ 7.5 (12)	94.3 $\pm$ 5.7 (13)	94.5 $\pm$ 4.6 (13)	92.2 $\pm$ 6.7 (11)
Number of live pups	15.1 $\pm$ 2.4 (12)	13.7 $\pm$ 2.9 (13)	15.3 $\pm$ 1.7 (13)	14.1 $\pm$ 2.2 (11)
Birth index	93.9 $\pm$ 7.5 (12)	93.6 $\pm$ 5.5 (13)	94.0 $\pm$ 5.0 (13)	91.2 $\pm$ 7.6 (11)
Live birth index	100.0 $\pm$ 0.0 (12)	99.4 $\pm$ 2.3 (13)	99.5 $\pm$ 1.7 (13)	98.8 $\pm$ 2.7 (11)
Sex ratio on day 0	54.7 $\pm$ 15.3 (12)	48.5 $\pm$ 12.6 (13)	52.2 $\pm$ 11.8 (13)	44.5 $\pm$ 8.7 (11)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	15.1 $\pm$ 2.4 (12)	13.6 $\pm$ 2.9 (13)	15.3 $\pm$ 1.7 (13)	14.1 $\pm$ 2.2 (11)
Viability index	100.0 $\pm$ 0.0 (12)	99.4 $\pm$ 2.1 (13)	100.0 $\pm$ 0.0 (13)	100.0 $\pm$ 0.0 (11)
Sex ratio on day 4	54.7 $\pm$ 15.3 (12)	48.9 $\pm$ 12.9 (13)	52.2 $\pm$ 11.8 (13)	44.5 $\pm$ 8.7 (11)

a): vehicle control, corn oil (5 ml/kg)

Gestation index = (number of 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 4 / number of live pups on day 4) $\times$ 100, %

Table 25

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

Body weight of F₁ pups up to day 4 of lactation; mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	OPBP			
	0 a)	12	60	300
Day 0 of lactation				
Number of live pups	15.1 $\pm$ 2.4 (12)	13.7 $\pm$ 2.9 (13)	15.3 $\pm$ 1.7 (13)	14.1 $\pm$ 2.2 (11)
Male	8.3 $\pm$ 2.7	6.8 $\pm$ 2.3	7.8 $\pm$ 1.2	6.4 $\pm$ 1.9
Female	6.8 $\pm$ 2.6	6.8 $\pm$ 1.6	7.5 $\pm$ 2.5	7.7 $\pm$ 1.3
Weight of pup (g)				
Male	6.8 $\pm$ 0.5 (12)	6.9 $\pm$ 0.8 (13)	6.5 $\pm$ 0.3 (13)	6.9 $\pm$ 0.5 (11)
Female	6.5 $\pm$ 0.5 (12)	6.5 $\pm$ 0.6 (13)	6.3 $\pm$ 0.4 (13)	6.5 $\pm$ 0.5 (11)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	15.1 $\pm$ 2.4 (12)	13.6 $\pm$ 2.9 (13)	15.3 $\pm$ 1.7 (13)	14.1 $\pm$ 2.2 (11)
Male	8.3 $\pm$ 2.7	6.8 $\pm$ 2.3	7.8 $\pm$ 1.2	6.4 $\pm$ 1.9
Female	6.8 $\pm$ 2.6	6.8 $\pm$ 1.6	7.5 $\pm$ 2.5	7.7 $\pm$ 1.3
Weight of pup (g)				
Male	11.0 $\pm$ 1.0 (12)	11.5 $\pm$ 1.9 (13)	10.6 $\pm$ 1.0 (13)	11.1 $\pm$ 1.2 (11)
Female	10.6 $\pm$ 1.0 (12)	11.0 $\pm$ 1.5 (13)	10.1 $\pm$ 1.0 (13)	10.6 $\pm$ 1.1 (11)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 26

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

Morphological findings in F₁ pups on day 4 of lactation

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
Number of pups examined				
External observation	181	177	199	155
Visceral observation	181	177	199	155
Number of pups with				
External malformations	0	0	0	1 ^{b)}
Visceral malformations	0	0	0	0

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

b): anal atresia, and anury

Table 27

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

Morphological findings in F₁ dead pups

Compound	OSBP			
	0 ^{a)}	12	60	300
<u>No. of dead pups examined</u>				
External observation	0	1	1	2
Visceral observation	0	1	1	2
<u>No. of dead pups showing abnormalities</u>				
External malformations	0	1 ^{b)}	0	0
Visceral malformations	0	1 ^{c)}	0	0

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

b): anasarca, short trunk, anophthalmia (both), reduction deformity of the limbs, club foot, anal atresia, and filamentous tail

c): This dead pup was the same one with external malformations; renal agenesis (left), adrenal agenesis (left), hydronephrosis (right), transposition of the great vessels, and lobulation anomaly of the lung (right)