

最終報告書

2-ヒドロキシベンズアルデヒドのラットを用いた経口投与による
反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験

株式会社ボツリサーチセンター

目 次

	頁
要 約	1
緒 言	3
試験材料および方法	5
1. 被験物質および媒体	5
1) 被験物質	5
2) 媒体	5
3) 被験液の調製および濃度確認	6
2. 試験動物	6
3. 飼育条件	6
4. 個体識別およびケージへの表示	7
5. 投与量、群構成および動物数	7
6. 投与量とその設定根拠	8
7. 投与経路、投与方法および投与期間	8
8. 観察、測定、検査の方法および頻度	8
1) 雄 (P)	8
(1) 一般状態の観察	8
(2) 体重測定	9
(3) 摂餌量測定	9
(4) 血液学的検査	9
(5) 血液化学的検査	10
(6) 剖検	12
(7) 器官重量測定	12
(8) 病理組織学的検査	12
2) 雌 (P)	12
(1) 一般状態の観察	12

	頁
(2) 性周期の観察	13
(3) 体重測定	13
(4) 摂餌量測定	13
(5) 分娩および哺育観察	13
(6) 剖検	14
(7) 器官重量測定	14
(8) 病理組織学的検査	14
3) 親動物 (P) の交配	14
4) 新生児 (F ₁)	15
9. 統計学的方法	15
試験結果	17
I. 雄 (P) に及ぼす影響	17
1. 一般状態	17
2. 体 重	17
3. 摂餌量	17
4. 血液学的検査	17
5. 血液化学的検査	17
6. 剖検所見	18
7. 器官重量	18
8. 病理組織学的検査	18
II. 雌 (P) に及ぼす影響	18
1. 一般状態	18
2. 体 重	19
3. 摂餌量	19
4. 剖検所見	19
5. 器官重量	19
6. 病理組織学的検査	20

	頁
Ⅲ．生殖発生毒性	20
1．親動物（P）の生殖発生毒性に及ぼす影響	20
1）性周期	20
2）交尾率および受胎率	20
3）妊娠期間、分娩および哺育状態	21
4）生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数 および着床率	21
2．新生児（F ₁ ）に及ぼす影響	21
1）生存児数、死産児数、分娩率および出生率	21
2）性比、外表異常、新生児生存率、体重および剖検所見	22
考 察	23
文 献	26

Figures and Tables

Fig. 1	Body weights of males
Fig. 2	Food consumption of males
Fig. 3	Body weights of females
Fig. 4	Food consumption of females
Table 1、2	Clinical signs of males
Table 3	Body weights of males
Table 4	Food consumption of males
Table 5、6	Hematological findings of males
Table 7、8	Blood chemical findings of males
Table 9	Gross pathological findings of males
Table 10、11	Absolute and relative organ weights of males
Table 12	Histopathological findings of males
Table 13~15	Clinical signs of females
Table 16、17	Body weights of females
Table 18、19	Food consumption of females
Table 20	Gross pathological findings of females
Table 21、22	Absolute and relative organ weights of females

Table 23, 24	Histopathological findings of females
Table 25	Estrous cycle
Table 26	Reproductive performance of males and females
Table 27	Findings of delivery
Table 28	Findings of pups
Table 29	Body weights of pups
Table 30	Gross pathological findings of pups

要 約

2-ヒドロキシベンズアルデヒドのラットを用いた経口投与による反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験を0（対照群）、2.5、10、40および160 mg/kg/dayの用量を用いて行い、反復投与による雌雄動物における一般毒性学的影響を検索するとともに性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検索した。

I. 反復投与毒性

1. 雄（P）に及ぼす影響

- 1) 一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査値、血液化学的検査値、剖検所見および器官重量には被験物質投与の影響は認められなかった。
- 2) 40 mg/kg以上の被験物質投与群において肝臓の少葉周辺性脂肪化の程度およびその出現頻度が対照群に比べて減少した。

2. 雌（P）に及ぼす影響

- 1) 40 mg/kg投与群の1母体が妊娠22日の分娩途中で、また、160 mg/kg投与群の1母体が妊娠22日に死亡した以外には一般状態の変化は観察されなかった。160 mg/kg投与群において肝臓重量が高値を、卵巣重量が低値を示した。しかし、体重、摂餌量および剖検所見には被験物質投与の影響は認められなかった。
- 2) 40 mg/kg以上の被験物質投与群において肝細胞内のグリコーゲン量の軽微な増加が観察された。

以上、本試験条件下における一般毒性学的な無影響量は雌雄ともに 10 mg/kg/day であると考えられた。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物（P）の生殖発生毒性に及ぼす影響

- 1) 雌の性周期および発情回数、雌雄の交尾および受胎、雌動物の妊娠期間および分

娩に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。

- 2) 哺育の異常は、40 mg/kg以下の被験物質投与群には認められなかった。しかし、160 mg/kg投与群では哺育4日までに全児が死亡した母動物が2例認められた。
- 3) 生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率には被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 新生児 (F₁) に及ぼす影響

- 1) 哺育0日の生存児数、死産児数、性比、分娩率および出生率には被験物質投与の影響は認められなかった。
- 2) 新生児および死産児に被験物質投与に起因すると考えられる外表異常は認められなかった。
- 3) 哺育期間中の児の死亡は、160 mg/kg投与群において多い傾向が見られ、同群の哺育4日の新生児生存率は低い傾向にあった。また、哺育0日および4日の体重は160 mg/kg投与群においてわずかに低値を示す傾向にあった。

以上、本試験条件下における生殖発生毒性的な無影響量は、雄に関しては160 mg/kg/day、雌に関しては40 mg/kg/day、新生児に関しては40 mg/kg/day であると考えられた。

緒 言

2-ヒドロキシベンズアルデヒドはバラ科シモツケソウ類の花、タバコの葉等に含まれ、トマト、グレープ、シナモン、コーヒー、お茶等の匂いの成分としても存在する化学物質¹⁾であり、構造的にはサリチル酸に非常に類似している²⁾。また、本化学物質は石鹸、洗剤、香水等に0.005～0.2%の濃度で含有されている¹⁾。本化学物質の毒性データでは、ラットのLD₅₀値は経口投与で520 mg/kg、皮下投与で900 mg/kg、経皮投与で600 mg/kg、腹腔内投与で231 mg/kgであること、ラットに13日間反復混餌投与した場合、2%投与群では肝細胞の好塩基小体の著しい減少、脾臓細胞からのチモール顆粒の枯渇、1%投与群では肝および腎のマイクロボディーの数および大きさの増加、肝細胞の脂肪滴等の変化が起こること、さらに、乳頭腫または癌を誘発しないことが報告されている¹⁾。本化学物質はラット、マウスに100 mg/kgを単回皮下投与することによって低カルシウム血症が起こること、妊娠11日のラットに400 mg/kgを単回皮下投与することによりサリチル酸あるいはアスピリンの場合と同様に胎生期死亡の増加、口唇裂および多指等の外表奇形の出現が増加することが報告されている²⁾。また、これらのサリチル酸類における胎児毒性の主たる要因の一つは低カルシウム血症であることも報告されている²⁾。サリチル酸類の生殖発生毒性については多くの動物種で報告され、ヒトにおいてもプロスタグランジン生合成の抑制により遷延分娩、子宮からの出血等の影響についても報告されている^{3~6)}。

本試験は、本化学物質が人に継続的に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD Guideline for testing of Chemicals、Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Testに従って、2-ヒドロキシベンズアルデヒドを雌雄ラットに1日1回、雄には交配2週間前から交配期間を通して剖検前日までの49日間、雌には交配2週間前から交配期間、妊娠期間を通して哺育3日までの41～46日間経口投与し、反復投与による一般毒性学的な影響を検索するとともに、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検索した。なお、本試験は「新規化学物質に係る試験および指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について（昭和63年11月18日；環保業第39号環境庁企画調整局長、薬発第229号厚生省薬務局長、59基局第85号通商産業

省基礎産業局長連名通知)」に定める「新規化学物質に係る試験および指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設に関する基準」に基づいて実施した。

試験材料および方法

1. 被験物質および媒体

1) 被験物質

被験物質である 2-ヒドロキシベンズアルデヒドは
より提供された。被験物質の情報を以下に示した。

製 造 者 :

名 称 : 2-ヒドロキシベンズアルデヒド (2-Hydroxybenzaldehyde)

CAS 番号 : 90-02-8

構造式または示性式

: $C_7H_6O_2$

ロット番号 :

純 度 : 99.3%

性 状 : 無色～淡黄色透明油状液体

分 子 量 : 122.13

比 重 : 1.167

融 点 : -7°C

沸 点 : $196 \sim 197^{\circ}\text{C}$

保 存 方 法 : 窒素置換し、密閉・室温・暗所保存

なお、動物試験終了後に残余の一部を製造元であるセイミケミカル株式会社に送付し、品質試験を実施したところ、純度は 99.3% であったことが判明した (Attached data 1)。

2) 媒 体

媒 体 名 : オリーブ油 (丸石製薬株式会社)

ロット番号 : 4912、4×12

保 存 方 法 : 窒素置換し、密閉・室温保存

3) 被験液の調製および濃度確認

各投与群ごとに被験物質の必要量をビーカーに秤量し、5割容量のオリーブ油を加え、スターラーで攪拌して溶解した後、必要濃度に調製した。なお、被験物質は純度換算せず、原体重量で表示した。本被験物質の0.05～3.2 % (％) 液は、窒素置換・室温・暗所保存条件下で8日間安定であることが確認されている (Attached data 2) ことから、調製は1週間に2回の頻度で行った。調製後の被験液は、1日分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、窒素置換した上で室温・暗所保存した。なお、対照群の投与液 (オリーブ油) も同様に保存した。

被験液の濃度確認は雌雄の投与開始前および雄の投与最終週の2回、各濃度液についてHPLC法により株式会社ボゾリサーチセンターで実施した結果、いずれも表示値に対する割合は96.9～104.0 %の範囲であり、濃度は適切であった (Attached data 3、4)。

2. 試験動物

Crj: CD (SD) 系SPFラット (日本チャールス・リバー株式会社) の雌雄各75匹 (入荷匹数: 各78匹) を7週齢で購入し、1週間検疫・馴化飼育した後、雄は一般状態に異常がなく、体重増加が良好な動物60匹を選び8週齢で投与を開始した。雌は全動物の膣スメアを採取して性周期を観察し、性周期に異常がなく、体重増加が良好で一般状態に異常が認められない動物60匹を選び8週齢で投与を開始した。なお、投与開始時の体重範囲は雄で294～319 g、雌で195～223 gであった。

3. 飼育条件

動物は、検疫・馴化および動物試験期間を通して温度 22.5 ± 3.5 °C、相対湿度 50 ± 20 %、換気回数1時間10～15回、照明1日12時間 (午前7時～午後7時) に設定した飼育室 (603号室) で飼育した。

動物は、交配期間および妊娠17日から哺育4日までの期間を除き、金属製網ケージ (W190 × D350 × H170 mm: リードエンジニアリング株式会社) に個別飼育した。交配期間中は金属製網ケージ (W266 × D266 × H200 mm: 理工電機株式会社) で雌雄各1匹の計2匹を、また、雌については妊娠17日から哺育4日までの間、木屑 (ホワイトフレーク: 日本チャールス・リバー株式会社) を入れたプラスチック製エコン

ケージ（W340 × D400 × H185 mm：日本クレア株式会社）で個別飼育し、いずれも固型飼料（NMF：オリエンタル酵母工業株式会社）および飲料水（富士見水道組合）を自由に摂取させた。

飼料中の汚染物質の分析は、財団法人日本食品分析センターで実施した分析データを、飲料水の分析は、水道法に準拠した水質の分析を財団法人静岡県生活科学検査センターに定期的（年4回）に依頼し、得られたデータをそれぞれ入手し、本試験の成績に影響のないことを確認し、保管した。

4. 個体識別およびケージへの表示

動物は、検疫・馴化期間中に耳標識をつけて個体識別を行い、動物の尾には補助識別として油性インクでマーキングした。また、群構成後に耳標識番号と動物番号の照合表を作成した。飼育ケージには試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号および耳標識番号を明記し、投与量ごとに色分けしたケージラベルをつけた。

5. 投与量、群構成および動物数

群構成は、被験物質投与群に対照群を加え5群構成とし、1群の動物数は雌雄各12匹とした。群分けは、群分け当日の体重、検疫・馴化期間中の増体重、性周期の観察結果などにより動物を選択した後、当日の体重で層別化し、各群の平均体重ができるだけ均一となるようコンピュータを用いたブロック配置法により各群を構成した。なお、群分けは投与開始日に行った。群分け後の余剰動物はエーテル深麻酔により安楽死させた。

群	投与量 (mg/kg)	投与液 濃度(%, %)	雄		雌	
			動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	12	1001～1012	12	1101～1112
低用量群	2.5	0.05	12	2001～2012	12	2101～2112
中用量群	10	0.2	12	3001～3012	12	3101～3112
高用量群	40	0.8	12	4001～4012	12	4101～4112
最高用量群	160	3.2	12	5001～5012	12	5101～5112

6. 投与量とその設定根拠

投与量は、先に実施したラットを用いた2週間経口投与予備試験（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：R-559、投与量：0、50、100、200 および400 mg/kg）の結果を参考にして決定した。すなわち、400 mg/kg投与群では雄の5例全例、雌の5例中4例が、200 mg/kg投与群では雄の5例中1例、雌の5例中2例が投与7日までに死亡した。しかし、100 mg/kg以下の投与群では一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査値、血液化学的検査値等に明らかな被験物質投与の影響は認められなかった。したがって、本試験における最高用量は、死亡例の認められた200 mg/kgと被験物質投与の影響が認められなかった100 mg/kgのほぼ中間量に相当する160 mg/kgとし、以下、公比4で減じて40、10および2.5 mg/kgを設定した。

7. 投与経路、投与方法および投与期間

2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられること、また、OECD Guideline for testing of Chemicals、Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Testに従い経口投与を選択した。投与期間は、上記のガイドラインに従って、雄は交配前14日間およびその後35日間の計49日間、雌では交配前14日間、交配期間（最長5日間）、妊娠期間および哺育4日の剖検の前日までの41～46日間とし、1日1回、午前9時～午後4時30分の間に金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。対照群には溶媒（オリーブ油）のみを同様に投与した。投与容量は0.5 mL/100 gとし、個体毎の投与液量は、雄は各測定日の体重を、雌の交配前および交配期間中は各測定日の体重、妊娠期間中は妊娠0日、7日、14日および21日の体重、授乳期間中は哺育0日の体重を基準に算出した。

8. 観察、測定、検査の方法および頻度

1) 雄 (P)

(1) 一般状態の観察

一般状態の観察は、毎日、投与前、投与直後および投与後2時間の1日3回、中毒症状および行動異常の有無を観察した。但し、休日の観察は投与前および投与直後の2回とし、剖検日は剖検前1回とした。

(2) 体重測定

体重は、投与開始日（投与1日の投与前）、投与4日、8日、11日、15日、22日、29日、36日、43日および50日の午前9時から10時の間に測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、投与開始日および剖検日を除く、体重測定と同じ日の午前9時30分から10時の間に前日からの残量を測定し、給餌量との差から1日摂餌量を算出した。

(4) 血液学的検査

投与期間終了翌日の屠殺時に前日一夜（約16時間）絶食させた動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から採血した。

①腹大動脈から抗凝固剤（EDTA-2K）を加えた採血ビン（SB-41：東亜医用電子株式会社）に採取した血液を用いて以下の測定を行った。

検査項目	測定方法
赤血球数	電気抵抗変化検出法 ^{a)}
ヘモグロビン量	シアンメトヘモグロビン法 ^{a)}
ヘマトクリット値	$\frac{\text{平均赤血球容積} (\mu^3) \times \text{赤血球数} (10^4 / \text{mm}^3)}{10^3} \text{ } ^{a)}$
平均赤血球容積	電気抵抗変化検出法 ^{a)}
平均赤血球血色素量	$\frac{\text{ヘモグロビン量} (g / dl) \times 10^{a)}}{\text{赤血球数} (10^6 / \text{mm}^3)}$

検査項目	測定方法
平均赤血球	ヘモグロビン量 (g / dl) $\times 10^2$ ^{a)}
血色素濃度	ヘマトクリット値 (%)
網赤血球率	Brecher法
血小板数	電気抵抗変化検出法 ^{a)}
白血球数	電気抵抗変化検出法 ^{a)}
白血球百分率	May-Giemsa 染色による鏡検法

②採取した血液を3.8 %クエン酸ナトリウムを加えた試験管にとり、遠心分離 (3000 rpm、10分間) 後、得られた血漿を用いて以下の測定を行った。

検査項目	測定方法
プロトロンビン時間	クロット法 ^{b)}
活性化部分トロンボプラスチン時間	クロット法 ^{b)}
フィブリノーゲン量	トロンボプラスチン法 ^{b)}

使用測定機器

- a) コールター全自動8項目血球アナライザー T890 (株式会社日科機)
- b) 血液凝固測定装置 ACL100 (Instrumentation Laboratory)

(5) 血液化学的検査

血液学的検査のための採血と同時に腹大動脈から採取した血液を用いて、以下の検査を行った。

①採取した血液を試験管にとり遠心分離 (3000 rpm、10分間) し、得られた血清を用いて以下の測定を行った。

検査項目	測定方法
A/P	Bessey - Lowry法 ^{c)}
総コレステロール	CEH-COD-POD法 ^{c)}
トリグリセライド	GK-GPO-POD法 ^{c)}
リン脂質	PLD-ChOD-POD法 ^{c)}
総ビリルビン	アゾビリルビン法 ^{c)}
血糖	Hexokinase - G6PD法 ^{c)}
尿素窒素	Urease - GLDH法 ^{c)}
クレアチニン	Jaffé法 ^{c)}
ナトリウム	イオン選択電極法 ^{c)}
カリウム	イオン選択電極法 ^{c)}
塩素	イオン選択電極法 ^{c)}
カルシウム	OCPC法 ^{c)}
無機リン	モリブデン酸法 ^{c)}
総蛋白質	Biuret法 ^{c)}
A/G比	蛋白質分画比率から算出
蛋白質分画	セルロースアセテート膜による電気泳動法 ^{d)}

②腹大動脈からヘパリンを加えた容器に採取した血液を遠心分離（3000 rpm、10分間）し、得られた血漿を用いて以下の測定を行った。

検査項目	測定方法
GOT	UV-rate法 ^{c)}
GPT	UV-rate法 ^{c)}
LDH	UV-rate法 ^{c)}

使用測定機器

c) 全自動分析装置 Monarch (Instrumentation Laboratory)

d) 全自動電気泳動装置 CLINISCAN 2

(株式会社ヘレナ研究所)

(6) 剖 検

全動物を最終投与の翌日（投与開始後50日）に体重を測定した後、エーテル麻酔下で採血した後、剖検して内部器官および組織を肉眼的に観察した。さらに、脳、心臓、気管支を含む肺、肝臓、脾臓、下垂体、上皮小体を含む甲状腺、副腎、胸腺、腎臓、精巣、精巣上体を採取し、リン酸緩衝液（1/15M、pH 7.1～7.4）で調製した10%ホルマリン液に固定した。なお、精巣および精巣上体はブアン液に固定した。

(7) 器官重量測定

器官重量は、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣および精巣上体について測定し、最終体重から相対器官重量を算出した。

(8) 病理組織学的検査

全動物について、脳、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣および精巣上体をパラフィン包埋した。対照群と最高用量群について切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。なお、被験物質投与の影響が疑われた肝臓については全群について検索を実施した。さらに、肝臓の小葉周辺帯肝細胞細胞質内に微細～小型の空胞が観察されたので、その性状を詳細に検討するため代表例として対照群、40および160 mg/kg投与群の各3例（対照群：1007、1008、1009、40 mg/kg投与群：4004、4005、4006、160 mg/kg投与群：5001、5002、5003）についてOil red O 染色を実施した。

2) 雌 (P)

(1) 一般状態の観察

一般状態の観察は毎日、投与前、投与直後および投与後2時間の1日3回、中毒症状および行動異常の有無を観察した。但し、休日の観察は投与前および投与直後の2回とし、剖検日は剖検前1回とした。

(2) 性周期の観察

性周期の観察は、投与開始日から交尾が確認されるまで毎日膣スメアーを採取し、鏡検した。交配前の投与期間中は膣スメア像を発情前期、発情期、発情後期および発情休止期に分類し、発情期像発現回数および発情期から次の発情期までの日数（性周期）を調べた。また、交配期間中は膣スメア内の精子の有無を調べた。

(3) 体重測定

体重は、投与開始日（投与1日の投与前）、投与4日、8日、11日および15日、交配期間中週1回、妊娠期間中は妊娠0日、7日、14日および21日、哺育期間中は哺育0日および4日の午前9時から11時30分までの間に測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は、交配前は投与開始日を除く体重測定と同じ日、妊娠期間中は妊娠1日、7日、14日および21日、哺育期間中は哺育1日および4日の午前9時から11時30分までの間に前日からの残量を測定し、給餌量との差から1日摂取量を算出した。

(5) 分娩および哺育観察

母動物は自然分娩させ、分娩異常の有無を観察した。分娩終了の確認は妊娠21日から妊娠25日まで毎日午前、午後の2回行い、分娩が午前10時までに終了していた場合、その日を哺育0日とした。交尾確認後25日の午前10時までに分娩がみられなかった40 mg/kg投与群の1例（No. 4104）については、エーテル麻酔下で放血致死させた後に剖検し、妊娠の成否を確認したところ子宮内に着床痕が観察されたため妊娠成立と判断し、内部器官および組織を肉眼的に観察するとともに、黄体数および着床痕数を数えた。

分娩終了が確認された母動物については出生児を哺育させ、哺育状態の観察を哺育4日まで毎日行った。

(6) 剖 検

哺育4日に母動物の全例をエーテル麻酔下で放血致死させた後に剖検して内部器官および組織を肉眼的に観察するとともに、黄体数および着床痕数を数えた。さらに、脳、心臓、気管支を含む肺、肝臓、脾臓、下垂体、上皮小体を含む甲状腺、副腎、胸腺、腎臓、卵巣、子宮、膣および肉眼的異常部位を採取し、リン酸緩衝液（1/15M、pH 7.1～7.4）で調製した10%ホルマリン液に固定した。なお、妊娠期間中に死亡した40および160 mg/kg投与群の母動物（40 mg/kg投与群：No. 4102、160 mg/kg投与群：5110）についても同様に処置した。また、哺育児が全て死亡した160 mg/kg投与群の母動物（No. 5101、5102）については、発見後すみやかにエーテル麻酔下で放血致死させた後に剖検して内部器官および組織を肉眼的に観察するとともに、黄体数および着床痕数を数え、採取した内部器官および組織はリン酸緩衝液（1/15M、pH 7.1～7.4）で調製した10%ホルマリン液に固定した。

(7) 器官重量測定

器官重量は、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および卵巣について測定し、最終体重から相対器官重量を算出した。

(8) 病理組織学的検査

全動物について、脳、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓および卵巣をパラフィン包埋した。対照群と最高用量群について切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。なお、被験物質投与の影響が疑われた肝臓については全群について切片を作製し、同様に検索を実施した。さらに、160 mg/kg投与群の代表例2例（5101、5108）についてPAS反応および唾液消化後PAS反応を実施した。また、肉眼的異常部位については、用量に関係なく鏡検した。

3) 親動物（P）の交配

被験物質を14日間にわたって投与した後、同一群内の雌雄を1対1の組み合わせで、終夜同居させた。同居期間は最長14日間として、交尾が確認されるまでとした。なお、交尾の確認は毎朝、膣栓形成あるいは膣垢中の精子の有無により行い、これらが確認された雌を交尾動物として、その日を妊娠0日とした。

4) 新生児 (F₁)

(1) 出生児の観察

哺育0日に生存児数、死産児数を数え、外表異常の有無を観察した。生存児は性別を判定し、体重を測定した後に全例を母動物に哺育させた。また、死産児は死後変化の著しいものを除いてリン酸緩衝液 (1/15M、pH 7.1~7.4) で調製した10%ホルマリン液に固定し、保存した。

(2) 哺育児の観察および測定

哺育児については、生死の観察を毎日1回行った。体重は、哺育0日 (出生日) および4日に測定した。哺育4日に全例の哺育児をエーテル麻酔下で放血致死させた後、剖検し、内部器官の異常の有無を観察した。

9. 統計学的方法

統計学的方法は次の検定法を用いて行い、有意水準は5および1%とした。なお、児は一腹の平均を一単位とした。

1) 多重検定

Bartlett法により各群の分散の均一性の検定を行った。その結果、分散が均一の場合には一元配置法による分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合、各群の例数が等しいときにはDunnett法を、各群の例数が異なるときにはScheffé法を用いて対照群と各投与群との一対比較検定を行った。分散が均一でない場合には、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、有意であれば対照群と各投与群との平均順位の差について、各群の例数が等しいときはDunnett型、または、各群の例数が異なるときはScheffé型の検定を行った。

体重、摂餌量、発情期像発現回数、性周期、同居日数、妊娠期間、血液学的検査値、血液化学的検査値、器官重量、黄体数、着床痕数、出生児数、着床率、性比、分娩率、出生率、新生児生存率

2) χ^2 検定

交尾率、受胎率、出産率

3) 各種データの算出式

交尾率(%) = (交尾確認動物数 / 交配動物数) × 100

受胎率(%) = (妊娠動物数 / 交尾確認動物数) × 100

出産率(%) = (生児出産母動物数 / 妊娠母動物数) × 100

妊娠期間(日) = 哺育0日(分娩確認日) - 妊娠0日

性 比 = 雄 / (雄 + 雌)

新生児生存率(%) = (哺育4日の生存児数 / 哺育0日の生児数) × 100

分娩率(%) = (総出産児数 / 着床痕数) × 100

出生率(%) = (哺育0日の生存児数 / 総出産児数) × 100

着床率(%) = (着床痕数 / 黄体数) × 100

試 験 結 果

I. 雄 (P) に及ぼす影響

1. 一般状態 (Tables 1、2、Appendices 1~10)

一般状態の変化は、投与期間を通じて対照群および被験物質投与群のいずれの例においても観察されなかった。

2. 体 重 (Figure 1、Table 3、Appendices 11~15)

被験物質投与群における体重は、対照群とほぼ同様の推移を示し、各測定日の体重および投与期間中 (投与1日~投与43日) の体重増加量には対照群との間に有意な差は認められなかった。

3. 摂餌量 (Figure 2、Table 4、Appendices 16~20)

被験物質投与群における摂餌量は、対照群とほぼ同様の推移を示したが、40 mg/kg投与群における投与36日、160 mg/kg投与群における投与15日、36日および43日の値に対照群との間に有意な高値が認められた。

4. 血液学的検査 (Tables 5、6、Appendices 21~30)

40 mg/kg以下の被験物質投与群では検査を実施した各項目に対照群との間に有意な差は認められなかった。160 mg/kg投与群では平均赤血球容積が高値を、平均赤血球血色素濃度が低値を、また、プロトロンビン時間の延長が認められ、対照群との間に有意な差が認められた。その他の項目には対照群と160 mg/kg投与群との間に有意な差は認められなかった。

5. 血液化学的検査 (Tables 7、8、Appendices 31~40)

40 mg/kg以下の被験物質投与群では検査を実施した各項目に対照群との間に有意な差は認められなかった。160 mg/kg投与群では塩素が低値を、A/G比およびアルブミン比率が高値を、 γ -グロブリン比率が低値を示し、対照群との間に有意な差が認められた。その他の項目には対照群と160 mg/kg投与群との間に有意な差は認められなかった。

6. 剖検所見 (Table 9、Appendices 41~45)

対照群および被験物質投与群のいずれの例においても剖検所見に異常は認められなかった。

7. 器官重量 (Tables 10、11、Appendices 46~55)

絶対重量および相対重量ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

8. 病理組織学的検査 (Table 12、Appendices 56~60)

被験物質投与に起因すると考えられる変化は肝臓で観察された。すなわち、小葉周辺性脂肪化の程度および出現頻度は2.5 および10mg/kg投与群では対照群と同様であったのに反して、40 mg/kg投与群では減少傾向、160 mg/kg投与群では減少を示した。なお、小葉周辺帯肝細胞細胞質内に空胞が認められたため対照群、40および160 mg/kg投与群の代表例についてOil red O 染色を実施し、検索した結果、肝細胞細胞質内空胞化はその程度に応じてOil red O 染色陽性を示したため、これらは脂肪であると判断した。

その他、心臓の軽微な限局性心筋炎が対照群に2例(1006、1011)、160 mg/kg投与群に4例(5002、5003、5004、5009)、腎臓の軽度な限局性尿細管上皮好塩基性化が対照群に1例(1007)、精巣の軽微な限局性精細管萎縮が1例(1004)観察された。

II. 雌(P)に及ぼす影響

1. 一般状態 (Tables 13~15、Appendices 61~75)

交配前および交配期間における一般状態の変化は、対照群および被験物質投与群のいずれの例においても観察されなかった。

妊娠期間中の一般状態の変化として、40 mg/kg投与群の1母体(No. 4102)が妊娠22日の分娩途中で、また、160 mg/kg投与群の1母体(No. 5110)が妊娠22日に死亡した以外には対照群および被験物質投与群のいずれの例においても観察されなかった。なお、160 mg/kg投与群の死亡例では死亡を発見するまでの一般状態に異常は認められなかった。なお、表には示さなかったが、同例では妊娠11日に左側頸部に結節

の形成が発見された。

哺育期間における一般状態の変化は対照群および被験物質投与群のいずれの例においても観察されなかった。なお、160 mg/kg投与群では乳頭の未発達例が2例 (No. 5101、5102) に観察された。これらの例では全ての哺育児が哺育2日あるいは3日に死亡したため、その時点で安楽死させた。

2. 体 重 (Figure 3、Tables 16、17、Appendices 76~85)

被験物質投与群における体重は、交配前、妊娠期間および哺育期間を通じて対照群とほぼ同様の推移を示し、2.5 mg/kg投与群における哺育0日の体重の有意な低値、哺育0~4日の体重増加量の有意な高値を除いて各測定日の体重および体重増加量には対照群との間に有意な差は認められなかった。

3. 摂餌量 (Figure 4、Tables 18、19、Appendices 86~95)

被験物質投与群における摂餌量は、交配前、妊娠期間および哺育期間を通じて対照群とほぼ同様の推移を示し、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

4. 剖検所見 (Table 20、Appendices 96~100)

40 mg/kg投与群の死亡例 (No. 4102) では胸腺の萎縮、肝臓の一部退色および副腎の肥大が観察された。また、160 mg/kg投与群の死亡例 (No. 5110) において左側頸部の皮下に結節、胸腺に暗赤色点散在および肺の暗赤色変化が観察された。同群における全児死亡例 (No. 5101、5102) の母動物では外部所見として乳頭の未発達が認められた。

その他の例の剖検所見に異常は認められなかった。

5. 器官重量 (Tables 21、22、Appendices 101~110)

40 mg/kg以下の被験物質投与群では絶対重量および相対重量ともに対照群との間に有意な差は認められなかった。160 mg/kg投与群では絶対重量および相対重量ともに肝臓が有意な高値を、右側卵巣が有意な低値を示した。同群のその他の臓器には絶対重量および相対重量ともに対照群との間に有意な差は認められなかった。

6. 病理組織学的検査 (Table 23、24、Appendices 111～115)

死亡例および全児死亡のため安楽死させた例の所見として、40 mg/kg投与群の死亡例(4102)では肝臓の中等度の小葉中心性壊死、副腎の軽度な束状帯肥大および胸腺の軽度な萎縮が、160 mg/kg投与群の死亡例(5110)では心臓の中等度の心筋変性、腎臓の軽度な尿細管上皮細胞壊死、胸腺の軽微な出血および肺の軽微なうっ血、乳癌が認められた。160 mg/kg投与群における安楽死させた2例(5101、5102)においては肝臓の軽度なグリコーゲン量の増加が認められた。

計画屠殺例では肝臓に被験物質投与に関連した変化が認められた。すなわち、40および160 mg/kg投与群において肝細胞内に蓄積しているグリコーゲン量の軽微な増加が認められ、その頻度は40 mg/kg投与群では2例(4103、4111)、160 mg/kg投与群では7例(5103、5104、5105、5106、5108、5109、5112)であった。また、40および160 mg/kg投与群の肝臓においてH E染色標本で肝臓の細胞質が腫大淡明化し明るくぬけて観察されたことから、その性状を詳細に検討するため160 mg/kg投与群の代表例2例(5101、5108)についてPAS反応および唾液消化後PAS反応を実施した結果、PAS反応陽性、唾液消化後PAS反応陰性であった。

その他、脾臓の髄外造血亢進が対照群の4例(1101、1104、1106、1112)、160 mg/kg投与群の3例(5103、5108、5109)に認められた。

Ⅲ. 生殖発生毒性

1. 親動物(P)の生殖発生毒性に及ぼす影響

1) 性周期 (Table 25、Appendices 116～120)

被験物質投与群における発情期発現回数および発情期から次の発情期までの日数(性周期)は対照群とほぼ同様であり、対照群との間に有意な差は認められなかった。

2) 交尾率および受胎率 (Table 26、Appendices 121～125)

交尾は対照群および被験物質投与群のいずれにおいても同居開始後5日以内に成立し、各群の交尾率は100%であった。また、交尾成立までに要した平均日数には

対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。また、妊娠は対照群および被験物質投与群の全例において成立し、各群の受胎率は100 %であった。

3) 妊娠期間、分娩および哺育状態 (Tables 14、15、27、Appendices 66~75、126~130)

被験物質投与群における妊娠期間は対照群とほぼ同様であり、有意な差は認められなかった。なお、前述のごとく、40 mg/kg投与群の1母体 (No. 4102) が妊娠22日の分娩途中で死亡した以外に分娩の異常は対照群および被験物質投与群のいずれにも観察されなかった。また、40 mg/kg投与群の1母体 (No. 4104) では妊娠25日においても分娩が観察されなかったため、剖検したところ着床痕が観察された。

哺育状況では、160 mg/kg投与群において乳頭の未発達例が2例 (No. 5101、5102) に観察され、全ての哺育児が哺育2日あるいは3日に死亡した。その他には哺育状況の異常は認められなかった。

4) 生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率 (Table 27、Appendices 126~130)

生児出産雌数は、対照群、2.5 および10mg/kg投与群では各12例中12例、40 mg/kg投与群では12例中10例、160 mg/kg投与群では12例中11例であり、出産率には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

被験物質投与群における黄体数、着床痕数および着床率は、対照群とほぼ同様であり、有意な差は認められなかった。

2. 新生児 (F₁) に及ぼす影響

1) 生存児数、死産児数、分娩率および出生率 (Table 27、Appendices 126~130)

被験物質投与群における生存児数、死産児数、分娩率および出生率は対照群とほぼ同等の値を示し、有意な差は認められなかった。

2) 性比、外表異常、新生児生存率、体重および剖検所見 (Tables 28~30、
Appendices 131~145)

性比には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。生存児数および死産児数の外表異常として、短軀および痕跡尾が対照群の死産児に1例 (No. 1104)、痕跡尾が160 mg/kg投与群の生存児に1例 (No. 5102) 観察されたのみであった。哺育期間中の児の死亡は、160 mg/kg投与群において多い傾向がみられたため、同群の哺育4日の平均生存児数が少なく、新生児生存率も低い傾向にあったが、対照群との間に有意な差は認められなかった。40 mg/kg以下の投与群における平均生存児数および新生児生存率は対照群とほぼ同等の値を示し、対照群との間に有意な差は認められなかった。

哺育0日および4日の体重は、160 mg/kg投与群において対照群に比べてわずかに低値を示す傾向にあったが、対照群との間に有意な差は認められなかった。40 mg/kg以下の投与群における体重は対照群とほぼ同等の値であった。

哺育4日の剖検では、いずれの例においても異常は認められなかった。

考 察

2-ヒドロキシベンズアルデヒドのラットにおける経口投与による反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験を0（対照群）、2.5、10、40および160 mg/kg/dayの用量を用いて行い、反復投与による雌雄動物における一般毒性学的な影響を検索するとともに性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生について検索した。

雄（P）に関して、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査値、血液化学的検査値、剖検所見および器官重量には被験物質投与の影響は認められなかった。なお、血液学的検査および血液化学的検査において、160 mg/kg投与群では平均赤血球容積の高値、平均赤血球血色素濃度の低値、プロトロンビン時間の延長、塩素の低値、A/G比およびアルブミン比率の高値、 γ -グロブリン比率の低値が認められ、対照群との間に有意な差が認められた。しかし、これらのいくつかの項目（平均赤血球容積、平均赤血球血色素濃度および塩素）はCrl:CDラットの正常範囲内の値であり、血液凝固系あるいは総蛋白質の上昇、血液濃縮を疑わせる他の関連項目に変化が認められない単一項目における変化であった。また、本被験物質はラットおよびマウスにおいて低カルシウム血症を起こすことが報告²⁾されているが、本試験では血液凝固因子の1つであるカルシウムの低下は認められなかった。これらのことから、これらの変化が被験物質投与による影響とは考えられない。病理組織学的検査において被験物質投与に起因すると考えられる変化は肝臓で認められた。すなわち、対照群において観察される小葉周辺性脂肪化の程度およびその出現頻度が40 mg/kg以上の被験物質投与群で減少した。しかし、その機序は明らかではなかった。

雌（P）に関して、交配前および交配期間における一般状態の変化は、対照群および被験物質投与群のいずれにも観察されなかった。妊娠期間中の一般状態の変化として、40 mg/kg投与群の1母体が妊娠22日の分娩途中で、また、160 mg/kg投与群の1母体が妊娠22日に死亡した。死亡例の病理組織学的検査において、死亡に直接関連すると考えられる共通した所見は両者には認められなかった。哺育期間における一般状態の変化は対照群および被験物質投与群のいずれにも観察されなかった。雌動物の体重、摂餌量および剖検所見には被験物質投与の影響は認められなかった。器官重量では160 mg/kg投与群において肝臓の高値、卵巣の低下が認められたが、40 mg/kg以下の被験物質投与

群には対照群との間に有意な差は認められなかった。病理組織学的検査において被験物質投与に起因すると考えられる変化は雄と同様に肝臓で認められたが、認められた変化は雄と異なっていた。すなわち、肝細胞内にグリコーゲン量の軽微な増加が 40 mg/kg 投与群の少数例、160 mg/kg 投与群の多数例に観察された。なお、40 および 160 mg/kg 投与群の肝臓においてヘマトキシリン・エオジン染色標本で肝細胞の細胞質が腫大淡明化し、明るくぬけていたため、その性状を P S A 反応および唾液消化後 P A S 反応で検索したところ、40 および 160 mg/kg 投与群で認められた変化は細胞内に分布するグリコーゲンを反映するものと考えられた。

以上、雌雄の一般状態、体重、摂餌量および剖検所見には被験物質投与の影響は認められなかった。しかし、160 mg/kg 投与群では雌の肝臓重量が高値を、卵巢重量が低値を示し、病理組織学的検査では雌雄における相違はあるものの 40 mg/kg 以上の投与群において肝臓に変化が認められた。したがって、本試験条件下における 2-ヒドロキシベンズアルデヒドの一般毒性学的な無影響量は、雌雄ともに 10 mg/kg/day であると考えられた。

親動物の生殖発生毒性に及ぼす影響に関して、雌の性周期および発情回数に及ぼす被験物質投与の影響ならびに雌雄の交尾および受胎に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。また、雌動物の妊娠期間および分娩にも被験物質投与の影響は認められなかった。なお、前述のごとく、40 mg/kg 投与群の 1 母体が妊娠 22 日の分娩途中で死亡した。しかし、160 mg/kg 投与群では分娩途中の死亡例は認められないことから、40 mg/kg 投与群における死亡は被験物質投与の影響であるとは考えられない。哺育状況では、40 mg/kg 以下の被験物質投与群には異常は認められなかった。160 mg/kg 投与群では乳頭の未発達に起因すると考えられる全哺育児の死亡例が 2 例認められた。しかし、乳頭の未発達と被験物質投与の影響との関係については明らかではない。新生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率には被験物質投与の影響は認められなかった。

新生児に関して、生存児数、死産児数、性比、分娩率および出生率には被験物質投与の影響は認められなかった。また、新生児および死産児に被験物質投与に起因する外表異常は認められなかった。哺育期間中の児の死亡は、対照群との間に有意な差は認めら

れないものの160 mg/kg投与群において多い傾向がみられ、新生児生存率が低い傾向にあった。また、哺育0日および4日の体重は160 mg/kg投与群においてわずかに低値を示す傾向にあった。サリチル酸あるいはアスピリンの150 mg/kgを妊娠8日～14日までの7日間にわたって経口投与した試験では哺育児の発育遅延、離乳率の低下が報告⁶⁾されている。したがって、本被験物質160 mg/kgの投与により、新生児の生存および発育に及ぼす影響が示唆された。しかし、40 mg/kg以下の投与群においては新生児の生存および発育に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。新生児の哺育4日の剖検では、いずれの例においても異常は認められなかった。

以上、生殖発生毒性的には性周期、交尾および受胎、妊娠期間および分娩に及ぼす被験物質投与の影響はいずれの投与群においても認められなかった。しかし、160 mg/kg投与群では全哺育児が死亡した母動物が2例認められ、また、新生児の生存・発育に及ぼす影響が示唆された。したがって、本試験条件下における生殖発生毒性的な無影響量は、雄に関しては160 mg/kg/day、雌に関しては40 mg/kg/day、新生児に関しては40 mg/kg/day であると考えられた。

文 献

- 1) D. L. J. Opdyke (1979) : Monographs on fragrance raw materials. *Fd Cosmet. Toxicol.* Vol 17, 903
- 2) H. Saito, A. Yokoyama, S. Takeno, T. Sakai, K. Ueno, H. Masumura and H. Kitagawa (1982): Fetal toxicity and hypocalcemia induced by acethylsalicylic acid analogues. *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.* Vol. 38, 209~220
- 3) C. A. Kimmel, J. G. Wilson and H. J. Shumacher (1971) : Studies on metabolism and identification of the causative agent in aspirin teratogenesis in rats. *Teratology.* Vol.4, 15~24
- 4) R. P. Koshakji and A. R. Schulert (1973) : Biochemical mechanisms of salicylate teratology in the rat. *Biochem. Pharmacol.* Vol. 22, 407~416
- 5) K. S. Khera (1975) : Evaluation of the cat for teratogenesis studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 37, 149~150
- 6) S. Tanaka, K. Kawashima, S. Nakaura, S. Nagao, T. Kuwamura, A. Takanaka and Y. Omori (1973) : Studies on teratogenic effects on salicylic acid and aspirin in rats as related to fetal distribution. *Cong. Anom.* Vol. 13 (2), 73~84

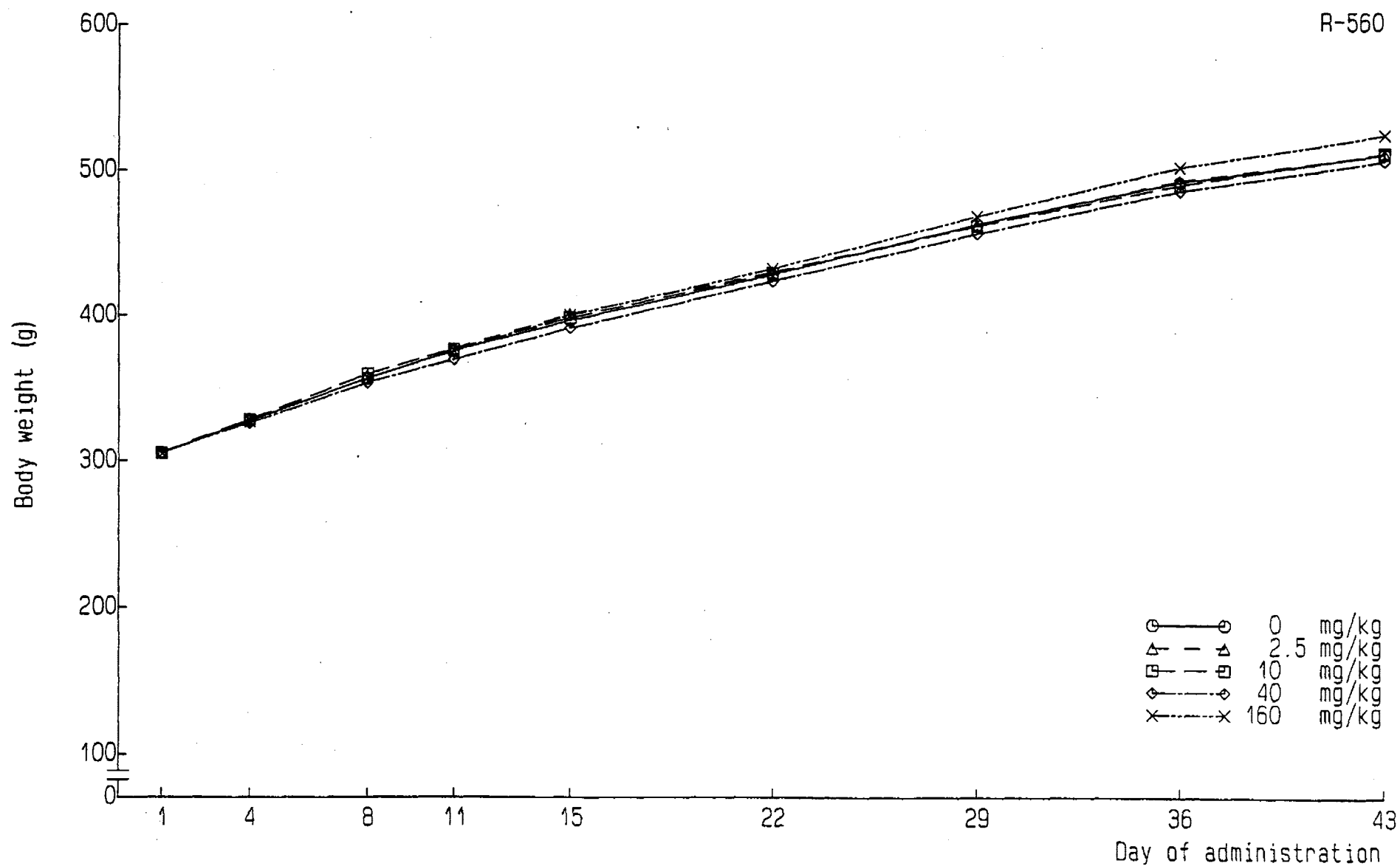


Figure 1 Body weight changes of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydrobenzaldehyde by oral administration

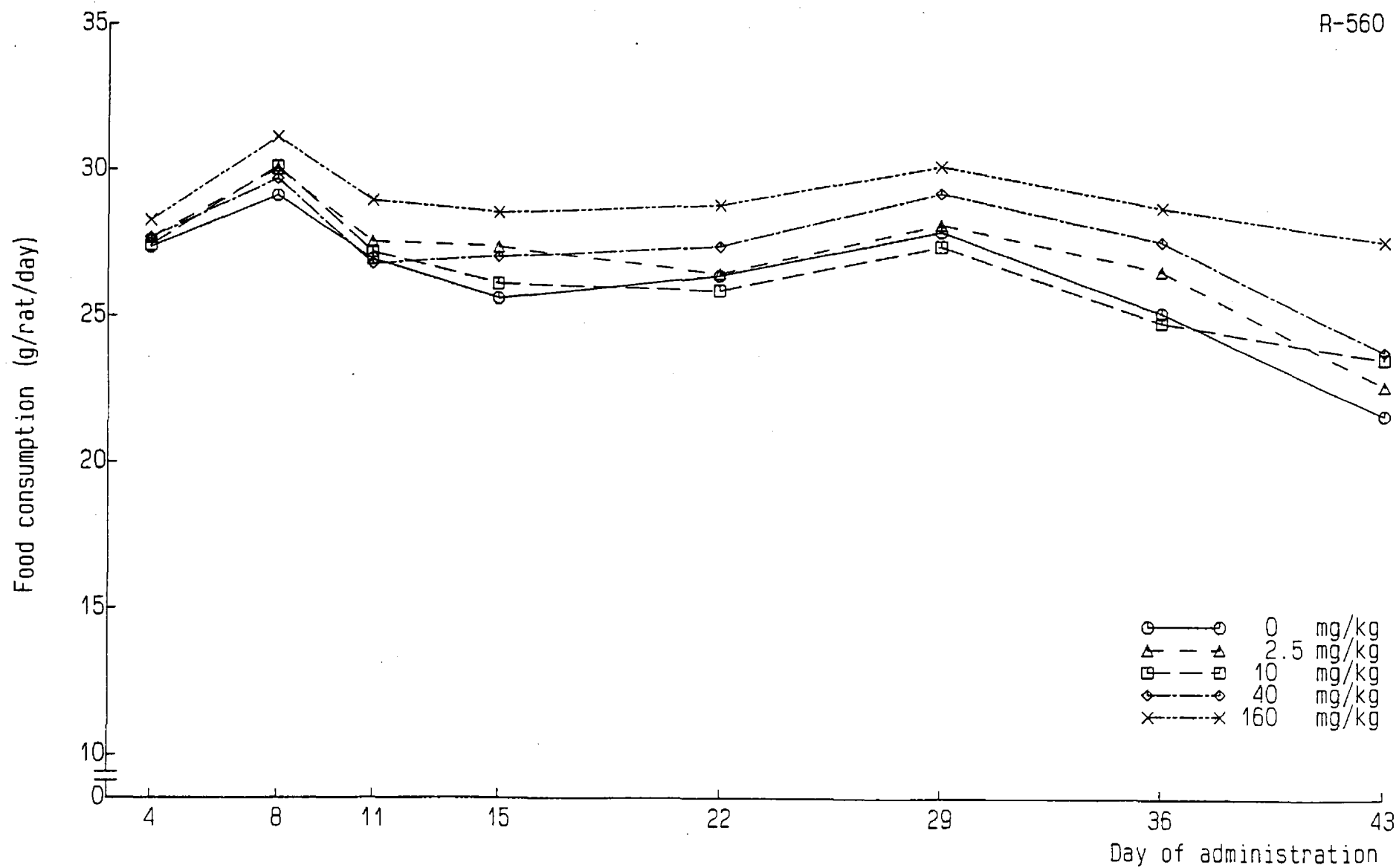


Figure 2 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

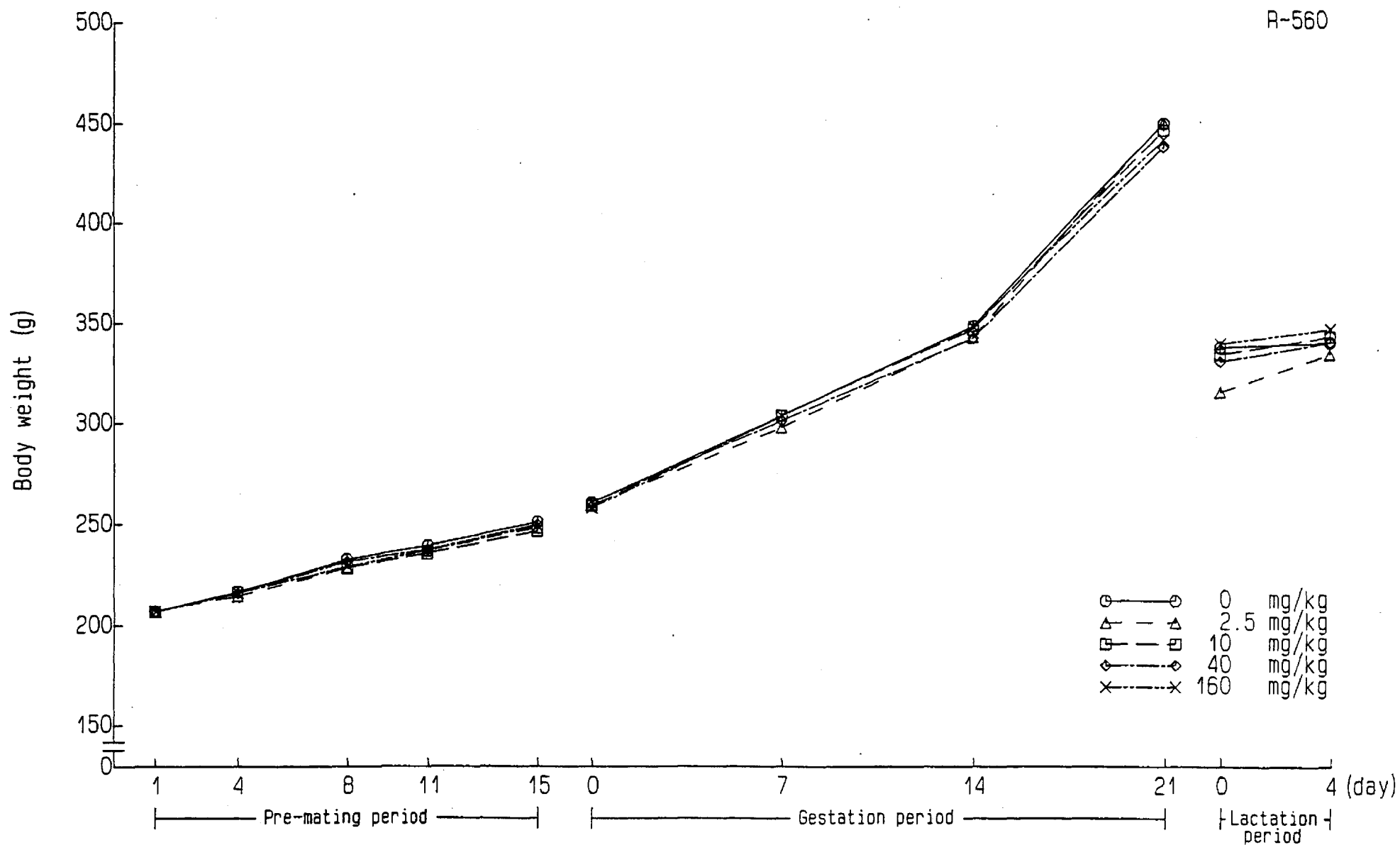


Figure 3 Body weight changes of female rats during the pre-mating, gestation and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

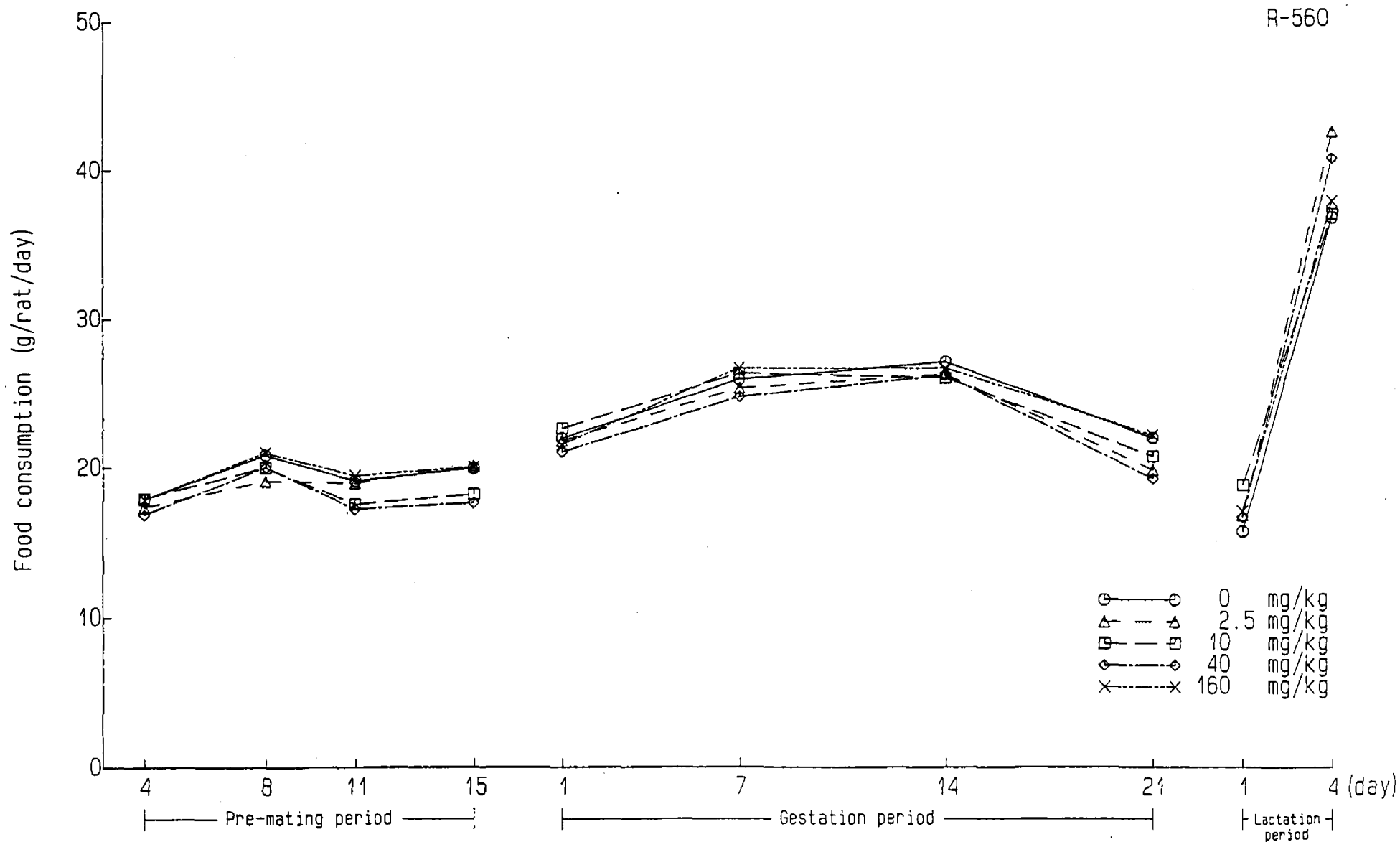


Figure 4 Food consumption of female rats during the pre-mating, gestation and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Table 1 Clinical signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	Symptoms	Day of administration																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.5	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* : Commencement of pairing

Table 2 Clinical signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	Symptoms	Day of administration																								
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50a)
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.5	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a): Autopsy day

Table 3 Body weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration										Gain
		1	4	8	11	15	22	29	36	43	50a)	1-43
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	305	327	356	375	396	427	462	491	510	502	205
	S.D.	7	8	11	13	17	21	24	27	32	33	31
2.5	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	306	328	359	377	401	429	462	492	511	505	205
	S.D.	7	10	12	13	15	23	27	29	33	35	29
10	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	305	328	359	376	398	428	461	489	511	503	206
	S.D.	7	8	10	12	15	17	21	22	24	26	22
40	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	305	325	353	369	391	423	455	485	506	498	200
	S.D.	7	9	12	15	18	22	22	25	23	23	20
160	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	305	327	356	375	400	431	467	501	524	511	219
	S.D.	7	9	8	9	10	11	15	18	19	17	18

Unit : g

No.: No. of animals

a) : Autopsy day

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 4 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration							
		4	8	11	15	22	29	36	43
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	27	29	27	26	26	28	25	22
	S.D.	2	3	3	3	3	2	2	3
2.5	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	28	30	28	27	26	28	27	23
	S.D.	2	3	3	3	3	3	2	4
10	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	27	30	27	26	26	27	25	24
	S.D.	2	2	3	2	2	2	2	2
40	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	28	30	27	27	27	29	28*	24
	S.D.	3	3	3	3	2	2	2	4
160	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	28	31	29	29*	29	30	29**	28**
	S.D.	2	3	2	1	2	2	2	3

Unit : g/rat/day

No.: No. of animals

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 5 Hematological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	No.		RBC $\times 10^4/\text{mm}^3$	Hb g/dl	Ht %	MCV μ^3	MCH pg	MCHC %	Reticu- locyte %	Plate- let $\times 10^4/\text{mm}^3$	PT sec.	APTT sec.	Fibri- nogen mg/dl
0	12	Mean	838	16.3	47	55.6	19.4	34.9	21	118.2	12.4	19.2	241
		S.D.	31	0.5	2	1.5	0.6	0.4	5	11.8	0.9	1.2	27
2.5	12	Mean	849	16.1	47	54.9	19.0	34.7	22	113.5	12.5	18.7	262
		S.D.	31	0.3	1	1.2	0.6	0.7	4	10.7	1.2	1.0	27
10	12	Mean	832	16.2	46	55.8	19.5	34.9	22	117.8	12.4	18.8	247
		S.D.	29	0.4	2	0.9	0.4	0.6	4	10.7	0.6	0.9	19
40	12	Mean	851	16.1	47	55.0	19.0	34.5	20	117.0	12.5	19.5	250
		S.D.	45	0.4	2	1.6	0.7	0.5	4	11.1	0.7	2.0	16
160	12	Mean	844	16.5	48	57.1*	19.5	34.2**	25	108.2	14.3**	20.4	245
		S.D.	32	0.3	1	1.3	0.5	0.4	4	8.4	1.7	1.6	21

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 6 Hematological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	No.		WBC $\times 10^3/\text{mm}^3$	Differential leukocyte counts (%)						
				Lymph.	Stab	Seg.	Eosino.	Baso.	Mono.	Others
0	12	Mean	100	88.0	0.0	10.8	0.6	0.0	0.7	0.0
		S.D.	17	4.3	0.1	4.1	0.5	0.0	0.4	0.0
2.5	12	Mean	109	85.2	0.0	14.0	0.3	0.0	0.5	0.0
		S.D.	29	5.8	0.1	5.4	0.5	0.0	0.7	0.0
10	12	Mean	111	87.5	0.0	11.6	0.3	0.0	0.5	0.0
		S.D.	31	4.5	0.0	4.4	0.3	0.0	0.4	0.0
40	12	Mean	106	88.5	0.0	10.8	0.3	0.0	0.5	0.0
		S.D.	35	4.4	0.0	3.8	0.3	0.0	0.8	0.0
160	12	Mean	112	86.8	0.0	12.4	0.5	0.0	0.3	0.0
		S.D.	24	8.3	0.0	7.8	0.7	0.0	0.4	0.0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 7 Blood chemical findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	No.		GOT IU/l	GPT IU/l	LDH IU/l	ALP IU/l	T.cho mg/dl	TG mg/dl	PL mg/dl	T.bili- rubin mg/dl	Glucose mg/dl	BUN mg/dl	Crea- tinine mg/dl
0	12	Mean	60	42	41	209	56	97	105	0.13	114	15	0.65
		S.D.	7	8	23	48	8	37	13	0.02	8	2	0.06
2.5	12	Mean	56	38	42	219	54	91	104	0.13	119	15	0.66
		S.D.	7	3	25	36	7	40	12	0.03	9	2	0.03
10	12	Mean	53	39	38	202	58	87	105	0.13	114	14	0.65
		S.D.	9	5	12	57	11	31	13	0.03	9	2	0.06
40	12	Mean	59	42	34	214	51	89	99	0.14	115	14	0.64
		S.D.	9	4	13	51	9	34	14	0.03	12	2	0.03
160	12	Mean	59	44	38	230	49	96	100	0.14	105	14	0.68
		S.D.	10	4	13	40	9	43	14	0.03	11	3	0.07

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8 Blood chemical findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	No.		Na	K	Cl	Ca	P	TP	A/G	Albumin	Globulin (%)			
			mEq/l	mEq/l	mEq/l	mg/dl	mg/dl	g/dl		%	α_1	α_2	β	γ
0	12	Mean	141	4.5	113	9.3	7.1	6.4	0.93	48.0	22.9	4.8	18.2	6.0
		S.D.	1	0.1	1	0.2	0.6	0.2	0.06	1.6	1.5	1.0	1.5	1.2
2.5	12	Mean	142	4.5	114	9.2	7.2	6.3	0.94	48.3	22.6	5.1	17.9	6.1
		S.D.	1	0.2	1	0.2	0.7	0.3	0.05	1.4	2.3	1.8	1.2	0.9
10	12	Mean	141	4.6	113	9.1	7.0	6.4	0.96	48.9	22.4	4.7	17.8	6.3
		S.D.	1	0.2	1	0.3	0.6	0.2	0.10	2.6	1.9	1.8	1.4	1.0
40	12	Mean	141	4.6	113	9.2	7.4	6.3	0.99	49.7	21.9	4.6	18.0	5.7
		S.D.	1	0.3	1	0.3	0.8	0.3	0.07	1.8	3.1	1.6	1.7	0.5
160	12	Mean	141	4.5	112*	9.3	7.3	6.1	1.08**	51.9**	22.1	4.4	16.8	4.8*
		S.D.	1	0.2	1	0.2	0.6	0.3	0.11	2.5	2.7	1.4	0.9	1.4

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 9 Gross pathological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose (mg/kg)	0	2.5	10	40	160
No. of animals examined	12	12	12	12	12
No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0

Table 10 Absolute organ weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		Body weight	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney		Testis		Epididymis	
			g	mg	g	g	mg	(R) g	(L) g	(R) g	(L) g	(R) mg	(L) mg
0	12	Mean	502	333	1.49	14.12	769	1.56	1.55	1.73	1.70	658	661
		S.D.	33	115	0.16	1.49	58	0.14	0.13	0.14	0.14	60	63
2.5	12	Mean	505	353	1.44	14.13	792	1.57	1.54	1.71	1.70	654	649
		S.D.	35	103	0.11	1.48	94	0.14	0.15	0.12	0.11	57	55
10	12	Mean	503	334	1.43	14.12	799	1.56	1.54	1.73	1.73	659	672
		S.D.	26	77	0.09	1.64	72	0.09	0.10	0.12	0.13	49	52
40	12	Mean	498	369	1.43	13.38	793	1.61	1.63	1.72	1.80	682	659
		S.D.	23	99	0.12	1.03	124	0.16	0.17	0.12	0.37	59	62
160	12	Mean	511	352	1.46	13.77	762	1.58	1.61	1.67	1.67	645	627
		S.D.	17	58	0.09	0.72	87	0.13	0.11	0.13	0.11	50	56

No Significant difference in any treated groups from control group.

Table 11 Relative organ weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney		Testis		Epididymis	
			mg%	g%	g%	mg%	(R) g%	(L) g%	(R) g%	(L) g%	(R) mg%	(L) mg%
0	12	Mean	67	0.30	2.81	154	0.31	0.31	0.35	0.34	132	132
		S.D.	23	0.02	0.18	12	0.03	0.02	0.04	0.04	14	14
2.5	12	Mean	70	0.28	2.79	157	0.31	0.31	0.34	0.34	130	129
		S.D.	21	0.02	0.14	18	0.02	0.03	0.03	0.03	18	15
10	12	Mean	66	0.29	2.80	159	0.31	0.31	0.34	0.35	131	134
		S.D.	15	0.02	0.22	15	0.01	0.01	0.03	0.03	11	10
40	12	Mean	74	0.29	2.69	159	0.32	0.33	0.35	0.36	137	133
		S.D.	21	0.02	0.16	24	0.02	0.03	0.03	0.07	12	13
160	12	Mean	69	0.29	2.70	149	0.31	0.31	0.33	0.33	126	123
		S.D.	12	0.02	0.15	19	0.03	0.03	0.03	0.02	12	12

No Significant difference in any treated groups from control group.

Histopathological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Organs	Dose (mg/kg)	0				2.5				10				40				160			
		No. of animals				No. of animals				No. of animals				No. of animals				No. of animals			
-findings	Grade	0	1	2	TE	0	1	2	TE	0	1	2	TE	0	1	2	TE				
Cerebrum		12		12		0				0				0		12	12				
Cerebellum		12		12		0				0				0		12	12				
Heart																					
-myocarditis / focal		10	2	12		0				0				0		8	4				
Liver																					
-lipid droplet / cytoplasmic			8	4	12	7	5	12		8	4	12		1	11	12	6				
Adrenal		12		12		0				0				0		12	12				
Spleen		12		12		0				0				0		12	12				
Kidney																					
-basophilic change / tubular epithelium / focal		11		1	12	0				0				0		12	12				
Testis																					
-atrophy / tubular / focal / bilateral		11	1	12		0				0				0		12	12				
Epididymis		12		12		0				0				0		12	12				

0 : No remarkable changes	1 : Slight	2 : Mild	TE : Total Examined
---------------------------	------------	----------	---------------------

Table 13 Clinical signs of female rats during the pre-mating and mating periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	Symptoms	Day of administration																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	18	19
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	8	4	1
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.5	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	3	0
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	6	3	0
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	7	4	2
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	9	5	0
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* : Commencement of pairing

Table 14 Clinical signs of dams during the gestation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	Symptoms	Day of gestation																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	0		
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
2.5	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	0		
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
10	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	1	0	
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
40	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	1	1	1
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Death during parturition	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
160	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	0		
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
	Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			

Table 15 Clinical signs of dams during the lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	Symptoms	Day of lactation				
		0	1	2	3	4
0	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
2.5	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
10	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
40	No. of dams	10 ^{a)}	10	10	10	10
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
160	No. of dams	11 ^{b)}	11	11	10 ^{c)}	9 ^{d)}
	No. of dams with abnormal findings	0	1	2	1	0
	Retarded development of nipple	0	1	2	1	0

a) : One dam died on day 22 of gestation and delivery in 1 dam was not found from days 21 through 25 of gestation but 4 implantation sites were observed at autopsy.

b) : One dam died on day 22 of gestation.

c) : One dam sacrificed on day 2 of lactation because all pups died.

d) : One dam sacrificed on day 3 of lactation because all pups died.

Table 16 Body weights of female rats during the pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration					Gain 1-15
		1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	207	217	232	239	251	44
	S.D.	8	9	9	8	9	9
2.5	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	207	215	228	237	248	41
	S.D.	8	10	11	12	14	11
10	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	207	216	229	235	246	40
	S.D.	8	8	10	10	14	12
40	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	207	216	231	237	250	43
	S.D.	8	7	11	9	11	8
160	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	207	216	229	237	249	42
	S.D.	7	9	9	14	17	13

Unit : g

No.: No. of animals

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 17 Body weights of dams during the gestation and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg		Day of gestation				Gain 0-21	Day of lactation		Gain 0-4
		0	7	14	21		0	4	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	261	303	348	450	189	338	340	2
	S.D.	11	13	18	29	21	24	15	15
2.5	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	259	298	343	450	191	315*	334	19**
	S.D.	14	16	19	22	20	21	13	15
10	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	259	304	347	446	187	334	343	9
	S.D.	13	17	20	31	26	18	20	10
40	No.	12	12	12	12	12	10 ^{a)}	10	10
	Mean	261	301	342	438	177	330	340	10
	S.D.	12	14	14	31	28	17	17	9
160	No.	12	12	12	12	12	11 ^{b)}	9 ^{c)}	9
	Mean	258	303	348	441	184	339	346	10
	S.D.	14	18	18	22	19	14	9	10

Unit : g

No.: No. of dams

a) : One dam died on day 22 of gestation and delivery in 1 dam was not found from days 21 through 25 of gestation but 4 implantation sites were observed at autopsy.

b) : One dam died on day 22 of gestation.

c) : One dam each was sacrificed on respective days 2 and 3 of lactation because all pups died.

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 18

Food consumption of female rats during the pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration			
		4	8	11	15
0	No.	12	12	12	12
	Mean	18	21	19	20
	S.D.	3	3	2	2
2.5	No.	12	12	12	12
	Mean	17	19	19	20
	S.D.	3	3	3	3
10	No.	12	12	12	12
	Mean	18	20	18	18
	S.D.	2	3	3	4
40	No.	12	12	12	12
	Mean	17	20	17	18
	S.D.	2	2	3	4
160	No.	12	12	12	12
	Mean	18	21	19	20
	S.D.	2	2	4	5

Unit : g/rat/day

No.: No. of animals

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 19 Food consumption of dams during the gestation and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg		Day of gestation				Day of lactation	
		1	7	14	21	1	4
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	22	26	27	22	16	37
	S.D.	3	4	4	4	5	5
2.5	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	22	25	26	20	17	43
	S.D.	2	4	3	5	8	5
10	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	23	26	26	21	19	37
	S.D.	2	3	3	2	6	9
40	No.	12	12	12	12	10 ^{a)}	10
	Mean	21	25	26	19	17	41
	S.D.	2	3	2	3	7	4
160	No.	12	12	12	12	11 ^{b)}	9 ^{c)}
	Mean	22	27	27	22	17	38
	S.D.	3	3	3	2	6	7

Unit : g/rat/day

No.: No. of dams

a) : One dam died on day 22 of gestation and delivery in 1 dam was not found from days 21 through 25 of gestation but 4 implantation sites were observed at autopsy.

b) : One dam died on day 22 of gestation.

c) : One dam each was sacrificed on respective days 2 and 3 of lactation because all pups died.

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 20 Gross pathological findings of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose (mg/kg)	0	2.5	10	40	160
Survival dams					
No. of dams examined	12	12	12	10	9
No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
Sacrificed or dead dams					
No. of dams examined	0	0	0	2	3
No. of dams with abnormal findings (%)	0	0	0	1 ^{a)} (50.0)	3 (100.0)
Thymus					
Atrophy	0	0	0	1 (50.0)	0
Disseminated dark red spots	0	0	0	0	1 ^{a)} (33.3)
Lung					
Dark red change	0	0	0	0	1 ^{a)} (33.3)
Liver					
Discoloration in part	0	0	0	1 (50.0)	0
Adrenal					
Enlargement (bilateral)	0	0	0	1 (50.0)	0
Subcutaneous					
Nodule at the left neck	0	0	0	0	1 ^{a)} (33.3)
Nipple					
Retarded development	0	0	0	0	2 ^{b)} (66.7)

a): Findings of dead dam

b): Findings of sacrificed dams

Table 21 Absolute organ weights of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	No. of dams		Body weight	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney		Ovary	
			g	mg	g	g	mg	(R) g	(L) g	(R) mg	(L) mg
0	12	Mean	340	241	1.07	13.28	710	1.03	1.04	63	55
		S.D.	15	67	0.15	0.99	75	0.07	0.07	9	6
2.5	12	Mean	334	192	1.00	13.21	677	1.09	1.07	62	55
		S.D.	13	60	0.10	0.75	107	0.12	0.10	9	5
10	12	Mean	343	282	1.03	12.97	659	1.03	1.03	57	54
		S.D.	20	79	0.08	1.26	83	0.08	0.08	11	6
40	10	Mean	340	240	0.98	13.58	648	1.00	1.00	54	50
		S.D.	17	49	0.05	1.15	70	0.06	0.06	7	5
160	9	Mean	346	188	1.00	15.36**	752	1.01	1.09	47**	47
		S.D.	9	49	0.10	1.02	77	0.05	0.27	7	7

** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 22 Relative organ weights of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	No. of dams		Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney		Ovary	
			mg%	g%	g%	mg%	(R) g%	(L) g%	(R) mg%	(L) mg%
0	12	Mean	71	0.31	3.91	209	0.31	0.31	19	16
		S.D.	20	0.05	0.31	18	0.03	0.02	3	2
2.5	12	Mean	58	0.30	3.96	203	0.33	0.32	19	16
		S.D.	17	0.03	0.22	31	0.03	0.03	3	2
10	12	Mean	82	0.30	3.79	193	0.30	0.30	17	16
		S.D.	23	0.04	0.33	26	0.03	0.04	3	2
40	10	Mean	71	0.29	4.00	191	0.30	0.30	16	15
		S.D.	13	0.02	0.31	19	0.02	0.02	2	1
160	9	Mean	54	0.29	4.43**	217	0.29	0.32	14**	14
		S.D.	15	0.03	0.30	20	0.02	0.08	2	2

** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 23

Histopathological findings of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Organs -findings	Dose (mg/kg) No. of animals Grade	0 Alive 12					2.5 Alive 12					10 Alive 12					40 Alive 10					40 Dead or Sacrificed 2				
		0	1	2	3	P TE	0	1	2	3	P TE	0	1	2	3	P TE	0	1	2	3	P TE	0	1	2	3	P TE
Cerebrum	12					12					0					0					0					0
Cerebellum	12					12					0					0					0					0
Heart																										
-degeneration / myocardial	12					12					0					0					0					0
Liver																										
-necrosis / centrilobular	12					12	12				12	12				12	10				10	1		1		2
-deposit / glycogen	12					12	12				12	12				12	8	2			10	2				2
Adrenal																										
-hypertrophy / zona fasiculata	12					12					0					0					0			1		1
Spleen																										
-hematopoiesis / extramedullary / increased	8	4				12					0					0					0					0
Kidney																										
-necrosis / tubular epithelium	12					12					0					0					0					0
Ovary	12					12					0					0					0					0
Other gross lesion																										
-Thymus : atrophy						0					0					0					0			1		1
: hemorrhage						0					0					0					0	1				1
-Lung : congestion						0					0					0					0					0
-Subcutaneous nodule : adenocarcinoma																										
/ mammary gland						0					0					0					0					0

0 : No remarkable changes 1 : Slight 2 : Mild 3 : Moderate P : Present a) TE : Total Examined

a): "Present" is used when grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion.

Table 24

Histopathological findings of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Organs -findings	Dose (mg/kg) No. of animals Grade	160									
		Alive 9					Dead or Sacrificed 3				
		0	1	2	3	P TE	0	1	2	3	P TE
Cerebrum		9				9	3				3
Cerebellum		9				9	3				3
Heart											
-degeneration / myocardial		9				9	2		1		3
Liver											
-necrosis / centrilobular		9				9	3				3
-deposit / glycogen		2	7			9	1		2		3
Adrenal											
-hypertrophy / zona fasiculata		9				9	3				3
Spleen											
-hematopoiesis / extramedullary / increased		6	3			9	3				3
Kidney											
-necrosis / tubular epithelium		9				9	2		1		3
Ovary		9				9	3				3
Other gross lesion											
-Thymus : atrophy						0	1				1
: hemorrhage						0		1			1
-Lung : congestion						0		1			1
-Subcutaneous nodule : adenocarcinoma											
/ mammary gland						0				1	1

0 : No remarkable changes 1 : Slight 2 : Mild 3 : Moderate P : Present a) TE : Total Examined

a): "Present" is used when grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion.

Table 25 Estrous cycle in female rats during the pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus					Mean±S.D.	Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4		
0	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5	4.4±0.6
2.5	12	0	0	0	11	1	3.1±0.3	4.4±0.4
10	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5	4.2±0.3
40	12	0	0	2	8	2	3.0±0.6	4.7±0.6
160	12	0	0	0	5	7	3.6±0.5	4.2±0.3

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 26 Reproductive performance of male and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg	No. of males	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) b)
0	12	12	3.0±1.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)
2.5	12	12	2.8±0.8	12/12(100.0)	12/12(100.0)
10	12	12	2.5±1.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)
40	12	12	3.0±1.3	12/12(100.0)	12/12(100.0)
160	12	12	3.1±1.0	12/12(100.0)	12/12(100.0)

a): (No. of pairs with successful copulation / No. of pairs mated) × 100

b): (No. of pregnant animals / No. of pairs with successful copulation) × 100

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 27 Findings of delivery on dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females a)	Gestation index (%)b)	Gestation length	No. of corpora lutea	No. of implan- tation sites	Implan- tation index % c)	No. of still- born	No. of live born	Live birth index % d)	Delivery index % e)
0	Total	12	12	100.0		248	207	83.5	2f)	183	98.9	89.4
	Mean				22.3	20.7	17.3		0.2	15.3		
	S.D.				0.5	4.7	3.1		0.4	4.0		
2.5	Total	12	12	100.0		257	223	86.8	4	208	98.1	95.1
	Mean				22.3	21.4	18.6		0.3	17.3		
	S.D.				0.5	3.5	2.6		0.7	2.2		
10	Total	12	12	100.0		226	184	81.4	0	165	100.0	89.7
	Mean				22.5	18.8	15.3		0.0	13.8		
	S.D.				0.7	3.6	4.8		0.0	4.3		
40	Total	12g)	10	83.3		198	172	86.9	2	152	98.7	89.5
	Mean				22.5	19.8	17.2		0.2	15.2		
	S.D.				0.5	2.4	1.7		0.6	2.5		
160	Total	12h)	11	91.7		214	185	86.4	7	152	95.6	85.9
	Mean				22.8	19.5	16.8		0.6	13.8		
	S.D.				0.4	2.3	2.0		0.9	3.1		

a): No. of females with live pups

b): $(\text{No. of females with live pups} / \text{No. of pregnant females}) \times 100$

c): $(\text{No. of implantation sites} / \text{No. of corpora lutea}) \times 100$

d): $(\text{No. of live pups on day 0} / \text{No. of pups born}) \times 100$

e): $(\text{No. of pups born} / \text{No. of implantation sites}) \times 100$

f): Short trunk and rudimentary tail were observed in 1 stillborn pup.

g): One dam died on day 22 of gestation and delivery in 1 dam was not found from days 21 through 25 of gestation but 4 implantation sites were observed at autopsy.

h): One dam died on day 22 of gestation.

No significant difference in any treated groups from control group.

3 Findings of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

No. of dams			No. of males	No. of females	Sex ratio a)	External malformations (%) b) c)	Day 0	Day 4	Viability index % d)
							No. of live pups	No. of live pups	
12	Total		97	86	0.53	0 (0.0)	183	179	97.8
	Mean		8.1	7.2			15.3	14.9	
	S.D.		3.2	3.1			4.0	3.8	
5	Total		105	103	0.50	0 (0.0)	208	203	97.6
	Mean		8.8	8.6			17.3	16.9	
	S.D.		2.4	2.0			2.2	1.7	
0	Total		83	82	0.50	0 (0.0)	165	163	98.8
	Mean		6.9	6.8			13.8	13.6	
	S.D.		3.1	2.2			4.3	4.3	
40	Total		78	74	0.51	0 (0.0)	152	151	99.3
	Mean		7.8	7.4			15.2	15.1	
	S.D.		2.7	2.5			2.5	2.5	
160	Total		82	70	0.54	e) 1 (0.7)	f) 151	125	82.8
	Mean		7.5	6.4			13.7	11.4	
	S.D.		2.2	2.0			3.3	6.1	

a): (No. of males / No. of live born pups)

b): No. of live born pups with external malformations

c): (No. of live born pups with external malformations / No. of live born pups) × 100

d): (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0) × 100

e): Rudimentary tail

f): One pup with external malformation was excluded.

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 29

Body weights of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose mg/kg		Male		Female	
		0	4	0	4a)
0	No.	12	12	12	12
	Mean	6.7	10.5	6.2	10.0
	S.D.	0.6	1.8	0.5	1.5
2.5	No.	12	12	12	12
	Mean	6.4	10.0	6.0	9.3
	S.D.	0.4	1.1	0.4	1.0
10	No.	11	11	12	12
	Mean	7.0	11.2	6.8	11.2
	S.D.	0.6	1.3	0.6	1.8
40	No.	10	10	10	10
	Mean	6.9	10.9	6.5	10.5
	S.D.	0.5	1.2	0.7	1.5
160	No.	11	9 ^{b)}	11	9 ^{b)}
	Mean	6.0	9.7	5.7	9.0
	S.D.	0.5	1.4	0.5	1.7

Unit : g

No.: No. of dams

a) : Day after birth

b) : All pups in 2 dams died on days 2 and 3 after birth.

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 30 Gross pathological findings of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Hydroxybenzaldehyde by oral administration

Dose (mg/kg)	0	2.5	10	40	160
Male					
No. of pups examined	95	102	82	78	67
No. of pups with abnormal findings	0	0	0	0	0
Female					
No. of pups examined	84	101	81	73	58
No. of pups with abnormal findings	0	0	0	0	0