

2, 4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンの  
ラットにおける  
反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

－最終報告書－

試験施設 : 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所

## 目 次

	頁
要 約 .....	1
緒 言 .....	3
試験材料及び方法 .....	3
試験成績 .....	9
考 察 .....	13
文 献 .....	15
Fig. 1 Mean body weight changes of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	17
Fig. 2 Mean body weight changes of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	18
Fig. 3 Mean food consumption of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	19
Fig. 4 Mean food consumption of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	20

Table 1	Clinical signs of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	21
Table 2	Clinical signs of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	24
Table 3	Body weights of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	28
Table 4	Body weights of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	29
Table 5	Food consumption of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	30
Table 6	Food consumption of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	31
Table 7	Hematological findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	32
Table 8	Biochemical findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	33
Table 9	Necropsy findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	34
Table 10	Necropsy findings of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	36
Table 11	Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	38
Table 12	Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	39
Table 13A	Histopathological findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	40
Table 13B	Histopathological findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	41
Table 14A	Histopathological findings of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	42
Table 14B	Histopathological findings of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	44
Table 15	Reproductive performance of rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	46

Table 16 Findings of delivery of F<sub>0</sub> dams treated orally with  
2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine and observations on their offspring  
in the combined repeat dose and reproductive/developmental  
toxicity screening test ..... 47

## 要 約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、2, 4-ジアミノ-6-フェニル-*s*-トリアジンの0 (媒体対照), 4, 20及び100 mg/kg/dayをCrj:CD (SD系) IGSラットの雌雄 (各12匹/群) に交配前14日間, 雄ではその後交配期間を含む35日間, 雌では交配期間, 妊娠期間及び哺育3日まで通して経口投与し, 親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討し, 以下の結果を得た。

### 1. 反復投与毒性

一般状態では, 100 mg/kg群の雄1例が投与18日から自発運動の低下及び緩徐呼吸を呈し, 投与21日に死亡した。また, 同群の雌1例が妊娠22日に死亡した。体重では, 雌雄とも20 mg/kg以上の群で増加抑制がみられ, 同群では摂餌量も減少した。

雄の血液学検査では, 100 mg/kg群で赤血球数及びヘマトクリット値の減少及び網状赤血球数の増加が認められた。

雄の血液生化学検査では, 100 mg/kg群でアルブミン, A/G比, GOT, GPT, 総コレステロール, リン脂質及び総ビリルビンの増加並びにトリグリセライド, ナトリウム及びカリウムの減少が認められた。

病理学検査では, 100 mg/kg群の雄で肝臓重量の増加がみられ, 組織学的には雌雄で小葉中心性の肝細胞の肥大が認められた。また, 死亡例では, 100 mg/kg群の雄1例で回腸の粘膜固有層から漿膜にかけて好中球性の細胞浸潤及び肉芽形成がみられたほか, 腺胃のびらん, 肺の水腫, 脾臓の萎縮, 胸腺の萎縮及び出血がみられ, 同群の雌1例で腺胃のびらん, 肺の水腫, 脾臓の萎縮及び副腎の壊死が認められた。

### 2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては, 性周期, 黄体数, 交尾率, 着床痕数, 授(受)胎率及び交尾所要日数に被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時の検査では, 100 mg/kg群の2例で分娩直後の児の回集及び保温の不良などが認められた。更に, 100 mg/kg群で死産率の増加及びそれに伴う出生率の減少, 雌雄新生児体重の減少が認められた。各群とも妊娠期間, 出産児数, 出産率, 新生児数及び新

生児の性比では被験物質投与の影響はみられず、新生児の外表検査においても、異常は認められなかった。

哺育期の検査では、20 mg/kg群の2例及び100 mg/kg群の7例で児の回集、授乳、保温などの哺育行動の不良がみられ、これらの母動物では全児が死亡した。また、20 mg/kg以上の群では母動物の哺育行動の不良に起因した新生児の4日の生存率の減少が認められた。更に、100 mg/kg群では新生児の哺育4日の体重に低値が認められた。

以上のように、反復投与毒性では20 mg/kg以上の群の雌雄で体重の増加抑制及び摂餌量の減少が認められたことから、本試験条件下における無影響量は雌雄とも4 mg/kgと推察された。生殖発生毒性では、親動物の生殖機能に被験物質投与の影響はみられなかったが、20 mg/kg以上の群で母動物に哺育行動の不良がみられ、100 mg/kg群で新生児の哺育4日の体重に低値が認められたことから、本試験条件下における無影響量は親動物に対しては雄で100 mg/kg、雌で4 mg/kg、児動物に対しては20 mg/kgと推察された。

## 結 言

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響を検討したので報告する。

## 試験材料及び方法

### 1. 被験物質

より提供された2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジン (Lot No. 純度98.0%) を試験に使用した (添付資料1)。本被験物質は、水、アセトン、DMSOに微溶、メタノール、エタノールに易溶である白色粉末であり、本試験の投与期間終了後に上記の提供先にて分析を行った結果、投与期間中安定であったことが確認された (添付資料2)。媒体は、カルボキシメチルセルロース・ナトリウム (CMC-Na, ナカライテスク株式会社, Lot No. M7T4661) の0.5 W/V%水溶液を使用した。なお、被験物質及び媒体原末は被験物質室の保管庫内に室温で保管した。

### 2. 使用動物及び飼育条件

8週齢のCrj:CD (SD系) IGSラット (日本チャールス・リバー株式会社) を雌雄各55匹購入し、13日間の検疫馴化を行った。この期間中に一般状態の観察及び体重測定を実施するとともに、雌雄各3匹について剖検を行い、異常がないことを確認したのち、順調な発育を示した動物を選んで10週齢で試験に使用した。なお、投与開始時の体重は雄で347.7~432.2 g、雌で220.3~255.2 gであった。

動物は温度 $24 \pm 2$  °C (許容範囲21~27°C)、湿度 $55 \pm 10$  % (許容範囲35~75%)、照明12時間 (午前7時~午後7時) 及び換気回数13~15回/時に設定したバリアーシステムC区域の飼育室 (92番) で、ステンレススチール製ケージ (W260×H200×D380 mm) に、検疫馴化期間中は雌雄別に2~3匹、投与期間中は雌雄別に1匹 (ただし、交配期間中は雌雄各1匹)、妊娠及び哺育期間中は床敷 (ホワイトフレーク, 日本チャールス・リバー株式会社製) を入れたポリカーボネイト製ケージ (W265×H185×D425 mm) に1匹ずつ (哺育期

間中は哺育児を含む) 収容し、飼育した。なお、温度の実測値は最高26℃、最低21℃、湿度の実測値は最高57%、最低50%であった。飼料は固型飼料(MF、オリエンタル酵母工業株式会社製)を、飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加した井戸水(約2 ppm)を自動給水装置又は給水瓶によりそれぞれ自由に摂取させた。飼料及び床敷については財団法人日本食品分析センターにて、飲水については株式会社鶴城南九科研センターにて分析し、いずれも許容基準に適合していることを確認した。なお、飼育器材及び飼料は高圧蒸気滅菌したものを使用し、ケージ架台及びポリカーボネイト製ケージ用上蓋は4週間に1回、ステンレススチール製ケージは2週間に1回、ポリカーボネイト製ケージ及び給水瓶は週1回以上、ステンレススチール製ケージの受皿は週3回(ただし、交配期間中は毎日)交換するとともに、飼育室は毎日清掃し、消毒薬を浸したモップで清拭した。

### 3. 試験群構成、投与量設定の根拠及び群分け

試験群構成を下表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	性別	動物数	動物番号
対照群	0	♂	12	1～12
		♀	12	51～62
低用量群	4	♂	12	13～24
		♀	12	63～74
中間用量群	20	♂	12	25～36
		♀	12	75～86
高用量群	100	♂	12	37～48
		♀	12	87～98

投与量は、先に実施した予備試験<sup>1)</sup>の結果より設定した。すなわち、本被験物質の30、100及び300 mg/kgを2週間反復経口投与した結果、300 mg/kg群で死亡が雄に、自発運動の低下、緩徐呼吸、体重減少、摂餌量の減少、GPT、総ビリルビン及び尿素窒素の増加、肝臓重量の増加などが雌雄に、100 mg/kg群で体重減少、摂餌量の減少、GPT、総ビ

リルピン及び尿素窒素の増加などが雄に、肝臓重量の増加が雌に認められたが、30 mg/kg群では被験物質投与による明らかな変化はみられなかった。したがって、本試験の高用量には投与期間の延長により雌雄動物に対して明確な影響が現れると推測される100 mg/kgを設定し、以下公比5で除した20及び4 mg/kgをそれぞれ中間用量及び低用量に設定した。

群分けは、投与開始前日に当日の体重を基に層別連続無作為化法により行い、群分け後の動物には動物番号を刻印した耳標を取り付けて個体識別した。また、各ケージには試験番号、動物番号、投与量及び性別を表示したラベルを付けた。なお、残余の動物は試験から除外した。

#### 4. 投与経路、投与方法及び投与期間

投与経路は、OECD試験法ガイドラインで指定されており、また、予想されるヒトへの曝露経路の一つである経口投与とした。雄は交配前14日間及びその後交配期間を含む35日間の合計49日間、雌は交配前14日間、交配期間(最長14日間)、妊娠期間及び哺育3日までの期間、連日1日1回、胃管を用いて投与した。投与容量は2.5 ml/kgとし、動物ごとの投与液量は、雄並びに交配前及び交配期間中の雌については最新の体重を基に、交尾成立後の雌については妊娠0日の体重を基にそれぞれ算出した。対照群には0.5 W/V% CMC-Na溶液を同様に投与した。

#### 5. 被験物質と媒体の混合物調製法

2, 4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンの必要量(純度換算せず)を秤り取り、0.5 W/V% CMC-Na溶液に懸濁して、0.16, 0.8及び4 W/V%懸濁液を調製した。調製は週1~2回の頻度で行い、被験液は投与時まで飼育区域内の保管庫に冷蔵遮光下で保存した。本調製法による被験液の均一性及び安定性試験は当研究所にて実施し、0.1及び20 W/V%懸濁液は均一であり、冷蔵遮光下で少なくとも8日間安定であることを確認した(添付資料3)。更に、初回に調製した被験液については当研究所にて分析を行い、設定濃度の許容範囲内(±10%以内)であることを確認した(添付資料4)。

## 6. 観察、測定及び検査方法

### 1) 一般状態観察並びに体重及び摂餌量測定

雌雄とも、全例について一般状態の観察及び生死の確認を毎日投与前及び投与後の2回行った。

体重については、雄では投与期間を通して週2回測定した。雌では、交配前の投与期間及び交配期間中は週2回、妊娠期間中は妊娠0、4、7、10、14、17及び21日、哺育期間中は哺育0（分娩日）及び4日に測定した。

摂餌量については、雄では交配期間を除く投与期間中に週2回測定した。雌では、交配前の投与期間中は週2回、妊娠期間中は妊娠1、4、7、10、14、17及び21日、哺育期間中は哺育1及び4日に測定した。

### 2) 血液学検査

雄の全例について、投与期間終了後に、18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム30 mg/kgを腹腔内投与して麻酔し、開腹後、後大静脈腹部から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2K処理（EDTA-2K加血液）して多項目自動血球計数装置（Sysmex CC-780、東亜医用電子株式会社）を用いて、白血球数（電気抵抗検出方式）、赤血球数（電気抵抗検出方式）、ヘモグロビン量（オキシヘモグロビン法）、ヘマトクリット値（血球パルス波高値検出方式）及び血小板数（電気抵抗検出方式）を測定し、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の測定結果を基にWintrobeの赤血球恒数〔平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）及び平均赤血球血色素濃度（MCHC）〕を算出した。更に、血液塗抹標本を作製して、ニューメチレンブルー超生体染色を施したのち、光学顕微鏡下で網状赤血球率を算出した。また、3.8%クエン酸ナトリウム加血液を3000回転/分で15分間遠心分離し、得られた血漿を用いて、全自動血液凝固測定装置（Sysmex CA-5000、東亜医用電子株式会社）によりプロトロンビン時間（散乱光検出方式）、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT、散乱光検出方式）及びフィブリノーゲン量（散乱光検出方式）を測定した。

### 3) 血液生化学検査

雄の全例について、血液学検査用に引き続き採取した血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置（7170、株式

会社 日立製作所)により、総蛋白質(ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、総ビリルビン(バナジン酸酸化法)、GOT(UVレート法)、GPT(UVレート法)、 $\gamma$ -GTP(L- $\gamma$ -グルタミル-3-ヒドロキシメチル-4-ニトロアニリド基質法)、アルカリ性フォスファターゼ(ALP, p-ニトロフェニルリン酸基質法)、総コレステロール(COD-HDAOS法)、トリグリセライド(GPO-HDAOS法・グリセリン消去法)、リン脂質(コリンオキシダーゼ・DAOS法)、グルコース(ヘキソキナーゼ・G-6-PDH法)、尿素窒素(BUN, ウレアーゼ・GDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、無機リン(IP, PNP-XOD法)及びカルシウム(Ca, MXB法)を測定した。また、総蛋白質及びアルブミンからA/G比を算出した。更に、電解質分析装置(PVA- $\alpha$  III, 株式会社アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(Na, 電極法)、カリウム(K, 電極法)及びクロール(Cl, 電量滴定法)を測定した。

#### 4) 剖検、器官重量の測定及び病理組織学検査

雄では投与期間終了後の採血を行ったのちに、雌では哺育4日にエーテル麻酔下で、外側腸骨動脈を切断して放血死させ、解剖して諸器官及び組織の肉眼的観察を行った。更に、雌については、黄体数及び着床痕数を調べた。剖検後、脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体及び卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに、剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。重量測定器官に加え、肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。なお、10%中性緩衝ホルマリン溶液による固定に先だって、精巣及び精巣上体はブアン液で前固定した。固定後、全群の肉眼的異常部位、対照群及び100 mg/kg群の脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体及び卵巣について、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。また、100 mg/kg群で変化がみられた肺、胸腺、肝臓及び脾臓については20 mg/kg群まで同様に検査を行った。

#### 5) 性周期検査及び生殖能力検査

雌について、投与開始日(投与1日)から15日間、毎日午前の一時間に膣垢を採取し、性周期検査を行った。性周期検査では、発情回数を算出するとともに、発情期から次の発情期までの間の日数を発情周期日数とし、平均発情周期を算出した。

交配は投与15日の午後4時頃から、雌雄(12週齢)1対1で一晩同居させる方法で行

い、翌朝膣垢中の精子又は膣栓の存在により交尾を確認し、その日を妊娠0日とした。また、交配は同一群内で行い、交配期間は最長2週間とした。交配期間終了後、交尾所要日数、交尾率〔(交尾動物数/同居動物数)×100〕及び授(受)胎率〔(妊娠動物数/交尾動物数)×100〕を算出した。

#### 6) 分娩及び哺育期(哺育4日まで)検査並びに新生児検査

交尾が確認された雌については全例を自然分娩させ、分娩徴候を含めた分娩状態並びに授乳及び営巣などの哺育状態を観察するとともに、妊娠期間、出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数)×100〕を算出した。なお、分娩の確認は午前中に限定し、12時を過ぎて分娩した個体は、翌日に分娩をしたものと見なした。出産児については、分娩時に出産児数、新生児数、死産児数、新生児の性別及び外表異常を検査した。新生児については、出生日及び哺育4日に体重を個体ごとに測定するとともに出生率〔(新生児数/着床痕数)×100〕、死産率〔(死産児数/出産児数)×100〕及び新生児の4日の生存率〔(哺育4日の生児数/新生児数)×100〕を算出した。哺育4日に新生児の全例をエーテル麻酔下で、器官・組織の肉眼的観察を行った。また、出産児(死産児及び死亡児を含む)については、剖検後一腹単位で純エタノールに固定保存した。

#### 7. 試験途中死亡例の処置

試験途中死亡例は速やかに剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を行った。なお、器官重量については参考データとした。

#### 8. 統計解析

体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値、交尾所要日数、性周期検査値(発情回数、発情周期)、器官重量、妊娠期間、黄体数、着床痕数、総出産児数、新生児数及び新生児体重については、各群ごとに平均値と標準偏差を求め、対照群と被験物質投与群間でまず分散の均一性をBartlett法により検定した。分散が均一な場合は、Dunnettの多重比較検定を用いて対照群との比較を行い、分散が均一でない場合は、Steelの多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。また、交尾率、授(受)胎率、出産率及び新生児の性比については $\chi^2$ 検定により、死産率、出生率及び新生児の4日の生存率についてはWilcoxonの順位和検定により、病理組織学検査については

Mann-WhitneyのU検定により対照群と各投与群間の比較を行った。いずれの場合も有意水準を5%とした。なお、新生児に関する測定値については一腹単位で処理した。

## 試 験 成 績

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態

一般状態所見をTable 1, 2及びAppendix 1, 2に示した。

雄では、100 mg/kg群の1例が投与18日の投与前から自発運動の低下及び緩徐呼吸を呈し、投与21日の投与前に死亡した。20 mg/kg以下の群では、死亡の発生はなく、一般状態にも変化は認められなかった。

雌では、100 mg/kg群の1例が妊娠22日の投与前に死亡した。このほか、100 mg/kg群の別の1例では、妊娠9日から剖検日(哺育4日)まで胸部の皮下腫瘍が認められた。20 mg/kg以下の群では、死亡の発生はなく、一般状態にも変化は認められなかった。なお、20 mg/kg群の2例及び100 mg/kg群の7例は、哺育3日までに全児が死亡したため、途中剖検した。

#### 2) 体重

体重推移をFig. 1, 2, Table 3, 4及びAppendix 3, 4に示した。

雄では、20 mg/kg以上の群で投与期間を通して体重の増加抑制又はその傾向がみられ、投与期間中の総体重増加量は有意な低値を示した。

雌では、100 mg/kg群で交配前の投与期間中の投与4及び8日に増加抑制が認められた。また、妊娠及び哺育期間中では20 mg/kg以上の群で体重の増加抑制又はその傾向が認められた。

#### 3) 摂餌量

摂餌量をFig. 3, 4, Table 5, 6及びAppendix 5, 6に示した。

雄では、20 mg/kg以上の群で投与初期に減少がみられ、その後、回復したが、交配期間終了後の投与後期には再度減少した。

雌では、20 mg/kg以上の群で投与初期に減少がみられ、その後、回復したが、哺育

4日には再度減少した。なお、100 mg/kg群では投与8～15日には増加が認められた。このほか用量相関のない偶発的変化として、4 mg/kg群で妊娠21日に増加が認められた。

#### 4) 血液学検査

雄の血液学検査結果をTable 7及びAppendix 7に示した。

100 mg/kg群で赤血球数及びヘマトクリット値の減少並びにMCH及びMCHCの増加が認められた。また、100 mg/kg群では網状赤血球数も増加した。なお、20 mg/kg群においてもMCHの増加が認められた。

#### 5) 血液生化学検査

雄の血液生化学検査結果をTable 8及びAppendix 8に示した。

100 mg/kg群でアルブミン、A/G比、GOT、GPT、総コレステロール、リン脂質及び総ビリルビンの増加並びにトリグリセライド、ナトリウム及びカリウムの減少が認められた。このほか、20 mg/kg群でGPT、アルカリ性フォスファターゼ及びクレアチニンの減少がみられたが、いずれも生理学的な変動範囲内(下表)の変化であった。

#### 17週齢Crj:CD (SD) ラットの背景データ

性	項目	動物数	平均値	標準偏差	平均値	平均値	最小値	最大値
					-2×標準偏差	+2×標準偏差		
雄	GPT (IU/l)	36	23.3	4.0	15.2	31.3	16	31
	ALP (IU/l)	36	178.0	34.1	109.7	246.2	131	258
	クレアチニン (mg/dl)	36	0.5	0.1	0.3	0.6	0.3	0.7

#### 6) 剖検

雌雄の剖検所見をTable 9, 10及びAppendix 9, 10に示した。

投与期間終了後の雄の剖検では、精巣及び精巣上体の萎縮が対照群でそれぞれ2及び1例、精巣上体の灰白色結節が対照群、4及び100 mg/kg群でそれぞれ1, 1及び2例認められた。

哺育4日の雌の剖検では、腎臓の灰白色斑及び皮下の灰白色腫瘤が100 mg/kg群で

各1例認められた。

死亡例の剖検では、100 mg/kgの雄1例で腺胃粘膜の暗赤色点、回腸及び盲腸の拡張、胸腺の萎縮及び暗赤色化並びに脾臓の萎縮がみられ、100 mg/kg群の雌1例で腺胃粘膜の暗赤色点、水様物による胃の膨満及び脾臓の萎縮が認められた。

全児死亡の母動物及び不妊例の剖検では、いずれも異常は認められなかった。

#### 7) 器官重量

雌雄の測定結果をTable 11, 12及びAppendix 11, 12に示した。

雄では、100 mg/kg群で胸腺の絶対及び相対重量の減少又は減少傾向、肝臓及び副腎の絶対及び相対重量の増加又は増加傾向が認められた。このほか雄では、100 mg/kg群で脾臓の絶対重量の減少が、また、20 mg/kg群で肺、腎臓、副腎、精巣及び精巣上体の相対重量の増加、100 mg/kg群で脳、心臓、肺、腎臓、精巣及び精巣上体の相対重量の増加が認められた。

雌では、100 mg/kg群で脳の相対重量の増加が認められた。

このほか、用量相関のない偶発的変化として、4 mg/kg群の雄で副腎の絶対重量の増加、20 mg/kg群の雌で心臓の絶対及び相対重量の減少が認められた。

#### 8) 病理組織学検査

雄の検査結果をTable 13A(グレード別出現例数)及び13B(総出現例数)並びにAppendix 13, 雌の検査結果をTable 14A(グレード別出現例数)及び14B(総出現例数)並びにAppendix 14に示した。

100 mg/kg群の雄5例及び雌7例で小葉中心性の肝細胞の肥大が認められた。このほか、雄では対照群、4及び100 mg/kg群のそれぞれ1、1及び3例で精巣上体の精子肉芽腫、対照群の2例で精巣の萎縮がみられ、精巣の萎縮がみられたうちの1例では精巣上体間腔内の精子の減少及びcell debrisも認められた。雌では、100 mg/kg群の1例で腎盂及び乳頭の移行上皮の増殖がみられ、同群では限局性の尿細管上皮の好塩基性化及び乳腺の腺癌がそれぞれ各1例認められた。更に、雌では対照群、20及び100 mg/kg群のそれぞれ1、3及び1例で胸腺の萎縮が認められた。

死亡例では、100 mg/kg群の雄1例で回腸の粘膜固有層から漿膜にかけて好中球性の細胞浸潤及び肉芽形成、腺胃のびらん、肺の水腫、脾臓の萎縮、胸腺の萎縮及び出

血、雌1例で腺胃のびらん、肺の水腫、脾臓の萎縮及び副腎の壊死が認められた。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 性周期検査及び生殖能力検査

性周期検査及び生殖能力検査の成績をTable 15及びAppendix 15に示した。

性周期検査では、各群とも発情回数及び発情周期において対照群との間に差は認められなかった。

生殖能力検査では、各群ともすべての例で交尾がみられたが、対照群及び100 mg/kg群の各1例が不妊であった。したがって、交尾率は各群とも100%、受(授)胎率は対照群、4, 20及び100 mg/kg群でそれぞれ91.67, 100, 100及び91.67%であり、対照群と各群との間に差は認められなかった。また、交尾所要日数においても、対照群と各群との間に差は認められなかった。

### 2) 分娩及び哺育期(哺育4日まで)検査並びに新生児検査

分娩及び哺育期検査の成績をTable 16及びAppendix 16に示した。

分娩時の検査では、100 mg/kg群の2例で分娩直後の児の回集及び保温の不良などが認められた。更に、100 mg/kg群で死産率の増加及びそれに伴う出生率の減少、雌雄新生児体重の減少が認められた。このほか、4 mg/kg群で死産率の増加がみられたが、20 mg/kg群では同様の変化は認められなかったことから、偶発的変化と考えられた。妊娠期間、黄体数、着床痕数、出産児数、新生児数、出産率及び新生児の性比では各群とも対照群との間に差は認められなかった。新生児の外表検査においても、各群とも異常は認められなかった。

哺育期の検査では、20 mg/kg群の2例及び100 mg/kg群の7例で児の回集、授乳、保温などの哺育行動の不良がみられ、これらの母動物では全児が死亡し、20 mg/kg以上の群では新生児の4日の生存率の減少が認められた。更に、100 mg/kg群では雌雄とも新生児の哺育4日の体重に低値が認められた。

## 考 察

OECD既存化学物質安全点検に係わる毒性調査の一環として、2, 4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並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。

### 1. 反復投与毒性試験

一般状態では、100 mg/kg群の雄1例が投与18日から自発運動の低下及び緩徐呼吸を呈し、投与21日に死亡した。また、同群の雌1例が妊娠22日に死亡した。更に、20 mg/kg以上の群では雌雄とも体重の増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。

雄の血液学検査では、100 mg/kg群で赤血球数及びヘマトクリット値の減少がみられ、MCH及びMCHCの増加も認められた。しかし、ヘモグロビン量に変化はなく、病理組織学検査では脾臓で赤血球の破壊像であるヘモジデリンの沈着等は認められなかった。赤血球数及びヘマトクリット値は摂餌量の制限により減少することも報告されている<sup>2)</sup>ことから、100 mg/kg群でみられた赤血球数及びヘマトクリット値の減少は、同群でみられた摂餌量の減少に起因した変化と考えられた。また、100 mg/kg群では赤血球の減少に伴う反応性の変化として、網状赤血球数の増加が認められた。なお、20 mg/kg群においてもMCHの増加が認められた。

雄の血液生化学検査では、100 mg/kg群でアルブミン、A/G比、GOT、GPT、総ビリルビン、総コレステロール及びリン脂質の増加並びにトリグリセライドの減少がみられたことから、肝臓への影響が示唆された。このほか、100 mg/kg群でナトリウム及びカリウムの減少がみられたが、電解質の変動と関連が深い腎臓では、病理組織学的にも異常はみられず、その発生機序については不明であった。

病理学検査では、100 mg/kg群の雄で肝臓重量の増加がみられ、組織学的には雌雄で小葉中心性の肝細胞の肥大が認められた。一般に肝臓の代謝酵素の誘導により小葉中心性の肝細胞が肥大することが知られている<sup>3)</sup>ことから、薬物代謝酵素が誘導された可能性が考えられた。なお、前述の如く血液生化学検査では肝胆道疾患の指標とされるGOT及びGPTの上昇がみられたが、肝細胞、胆管上皮の壊死等の傷害性変化は認められなかった。100 mg/kg群の雄では副腎重量の増加及び胸腺重量の減少がみられたが、いずれ

も対応する組織学的変化はなく、これらの変化はストレスが負荷された動物で観察されるものであり、100 mg/kg群の雄は投与期間を通して体重増加が抑制されていたことから、被験物質投与に関連したストレスに起因したものと考えられた。このほか、20 mg/kg群の雄で肺、腎臓、副腎、精巣及び精巣上体の相対重量の増加、100 mg/kg群の雄で脳、心臓、肺、腎臓、精巣及び精巣上体の相対重量の増加並びに脾臓の絶対重量の減少、100 mg/kg群の雌で脳の相対重量の増加がみられたが、いずれも絶対重量及び相対重量がともに変動したものはなく、病理組織学検査においても被験物質投与の影響はみられなかったこと、20 mg/kg以上の群では体重の増加抑制がみられ、最終体重が低値を示していることから、これらの変化は体重の低値に起因したものと考えられた。上述のほか病理組織学検査では、100 mg/kg群の雌で腎盂及び乳頭の移行上皮の増殖、限局性の尿管上皮の好塩基性化、乳腺の腺癌がみられたが、いずれも発生頻度は低く、自然発生することが知られている<sup>4-6)</sup>ことから、被験物質投与との関連性はないものと考えられた。また、4及び100mg/kg群の雄で精巣上体の精子肉芽腫、20及び100 mg/kg群の雌で胸腺の萎縮がみられたが、同様の変化は対照群においてもみられており、その変化の程度も同等であったことから、被験物質投与との関連性はないものと考えられた。

死亡した100 mg/kg群の雄1例では、回腸の好中球性の細胞浸潤及び肉芽の形成もみられたが、その発生原因については不明であった。このほか、肺の水腫、腺胃のびらん、脾臓の萎縮、胸腺の萎縮及び出血もみられたが、本例では死亡までに自発運動の低下及び緩徐呼吸が継続して認められていることから、衰弱に伴う変化と考えられた。また、死亡した100 mg/kg群の雌1例では、腺胃のびらん、肺の水腫、脾臓の萎縮及び副腎の壊死がみられたが、本例の死亡は分娩直前であったことから、周産期の生理的な負荷に被験物質投与の影響が加わったことにより生じた衰弱性の変化と考えられた。

以上のように、20 mg/kg以上の群の雌雄で体重の増加抑制及び摂餌量の減少が認められたことから、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも4 mg/kgと推察された。

## 2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、性周期、交尾率、授(受)胎率、交尾所要日数、黄体数及び着床痕数に被験物質投与の影響は認められなかった。また、妊娠期間、出産児数及び出産率にも被験物質投与の影響は認められなかった。一方、分娩時の観察では、100

mg/kg群の2例で分娩直後の哺育行動の不良が認められた。また、哺育期間の観察においては、全児死亡の母動物が20 mg/kg群で2例、100 mg/kg群で7例みられ、これらの例ではいずれも児の回集、授乳、保温などの哺育行動の不良が認められた。これらのことから、本被験物質の周産期投与による分娩及び哺育行動への影響が示唆された。

更に、100 mg/kg群では死産率の増加及びそれに伴う出生率の減少がみられたが、この変化については、前述した母動物の分娩直後の哺育行動の不良に起因したものと考えられた。また、20 mg/kg以上の群では、新生児の4日の生存率の減少がみられたが、この変化は、母動物に哺育行動の不良がみられ全児が死亡したことに起因したものであり、直接的な原因は母動物の哺育行動の不良と考えられた。また、新生児の体重では、100 mg/kg群で雌雄とも出生時の体重が低く、哺育4日においても増加抑制がみられたことから、胎生期及び哺育期の被験物質投与による胎児及び出生児の発育に及ぼす影響が示唆された。

以上のように、親動物の生殖機能に被験物質投与の影響はみられなかったが、20 mg/kg以上の群で母動物に哺育行動の不良がみられ、100 mg/kg群で新生児の哺育4日の体重に低値が認められたことから、本試験条件下における生殖発生毒性に関する無影響量は親動物に対しては雄で100 mg/kg、雌で4 mg/kg、児動物に対しては20 mg/kgと推察された。

## 文 献

- 1) 2, 4-ジアミノ-6-フェニル-*s*-トリアジンのラットにおける単回投与毒性試験及び反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験のための予備試験(試験番号：29734), 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ社内資料, 1998
- 2) Edozien, J. C. and Switzer, B. R.: Effect of Dietary Protein, Fat and Energy on Blood Hemoglobin and Hematocrit in the Rat. *J. Nutr.* 107, 1977, 1016-1021
- 3) J. R. Glaistar, "Principles of Toxicological Pathology," Taylor & Francis, London and Philadelphia, 1986, pp. 83-85

- 4) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," ed. by P. Greaves, Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation, Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 548-549
- 5) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," ed. by P. Greaves, Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation, Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 61-62
- 6) 渡辺 満利, "毒性試験講座 5. 毒性病理学", 前川 昭彦, 林 裕造編, 地人書館, 東京, 1992, p. 279

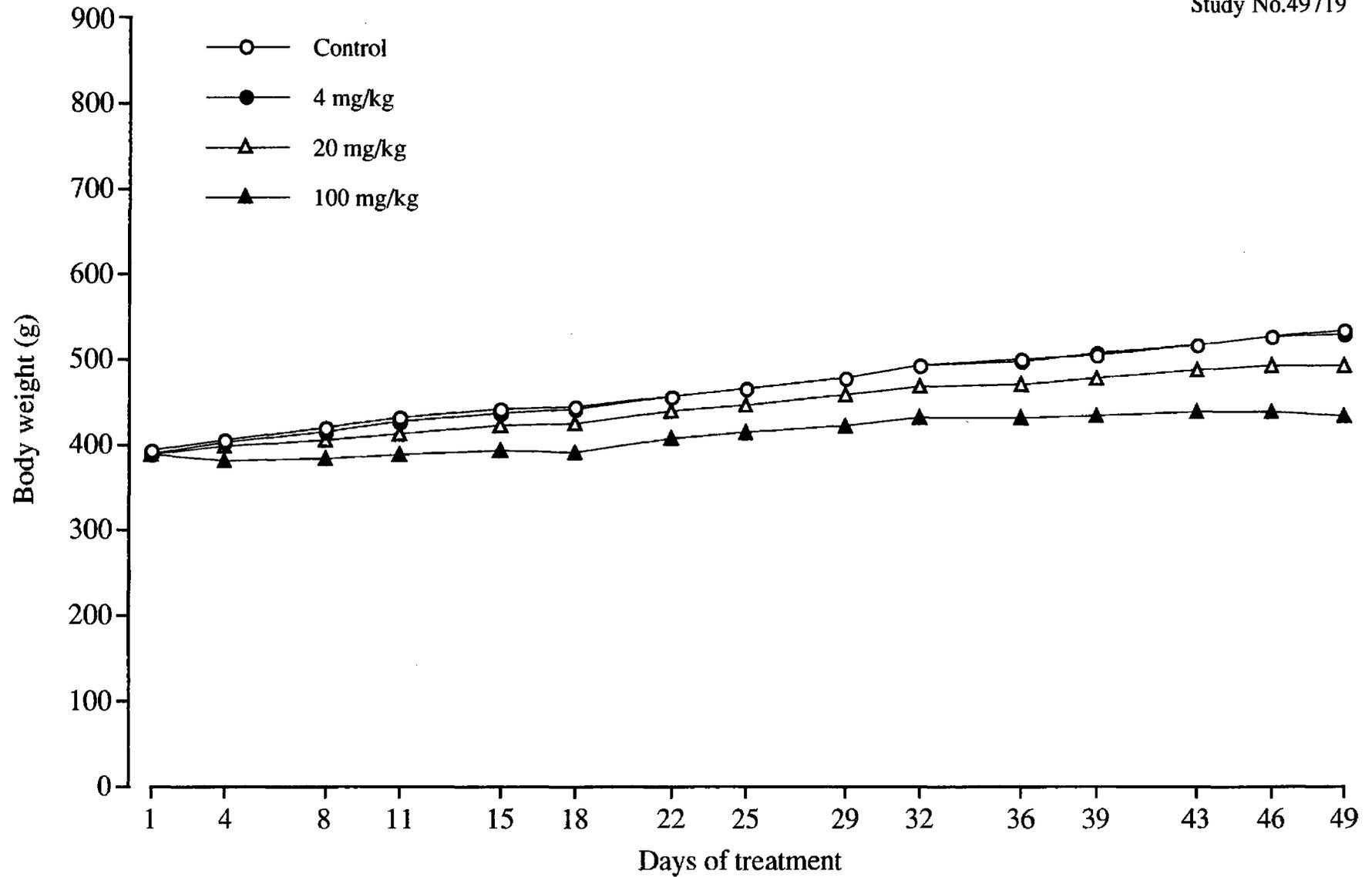


Fig. 1 Mean body weight changes of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

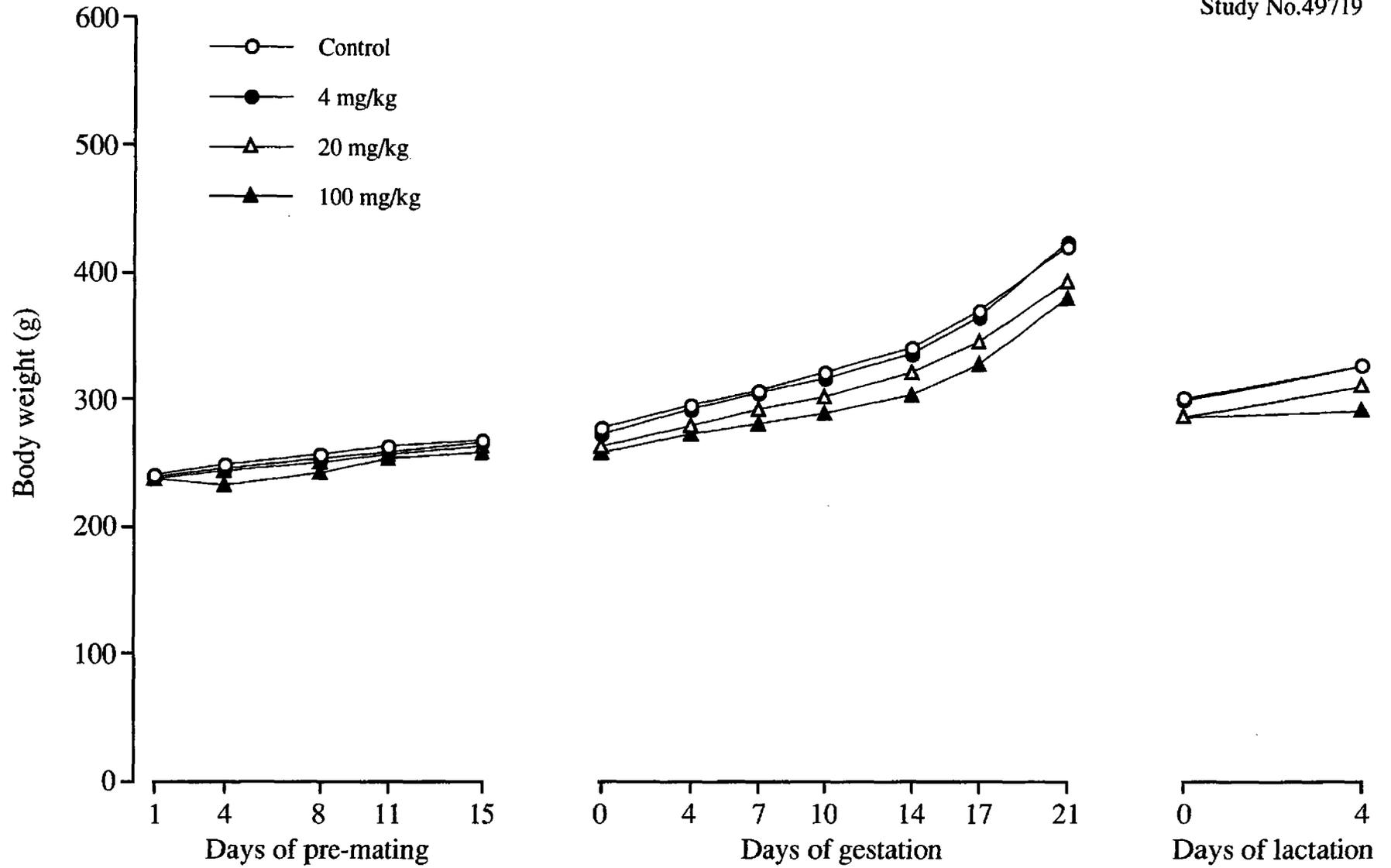


Fig. 2 Mean body weight changes of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

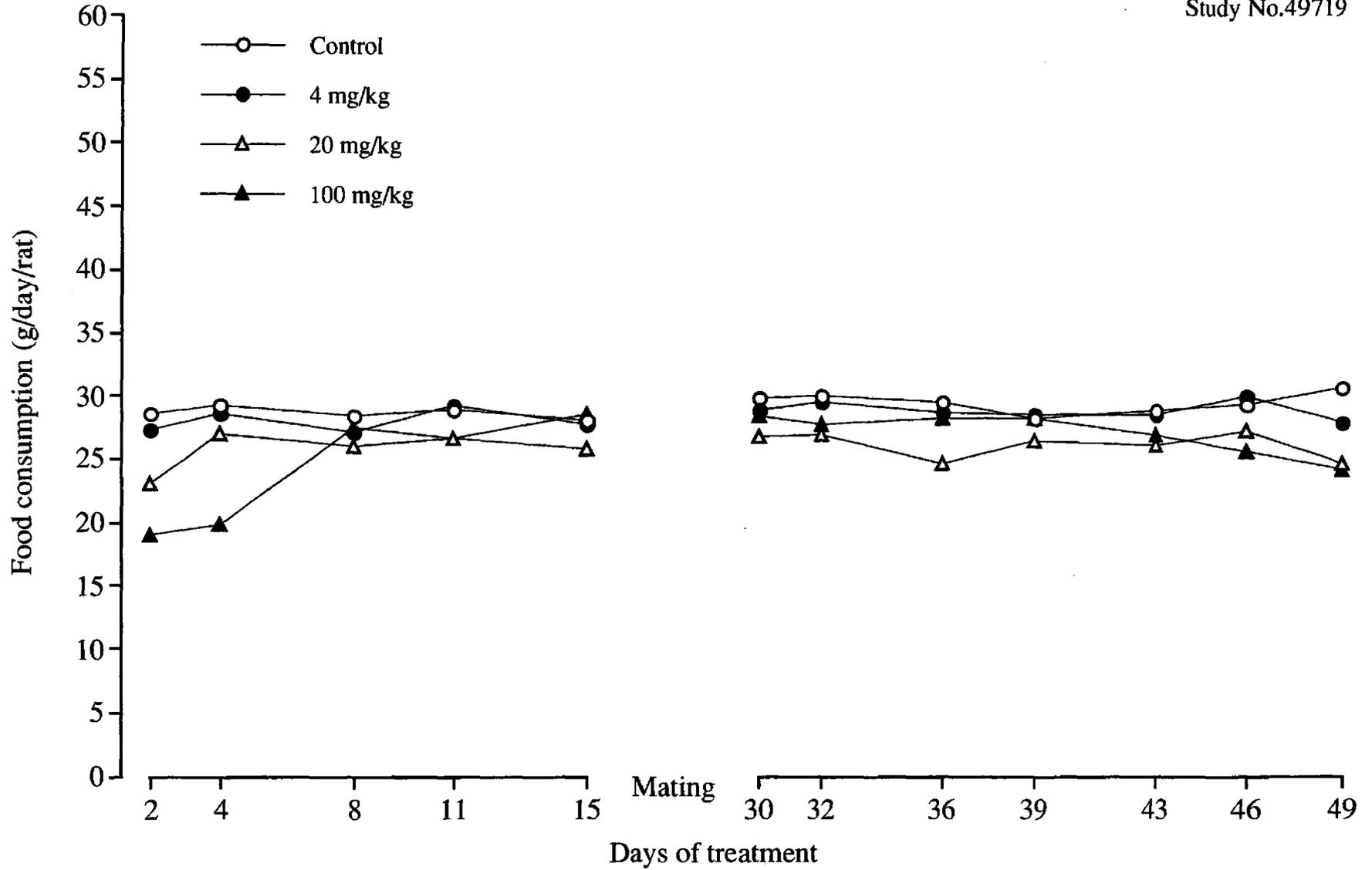


Fig. 3 Mean food consumption of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

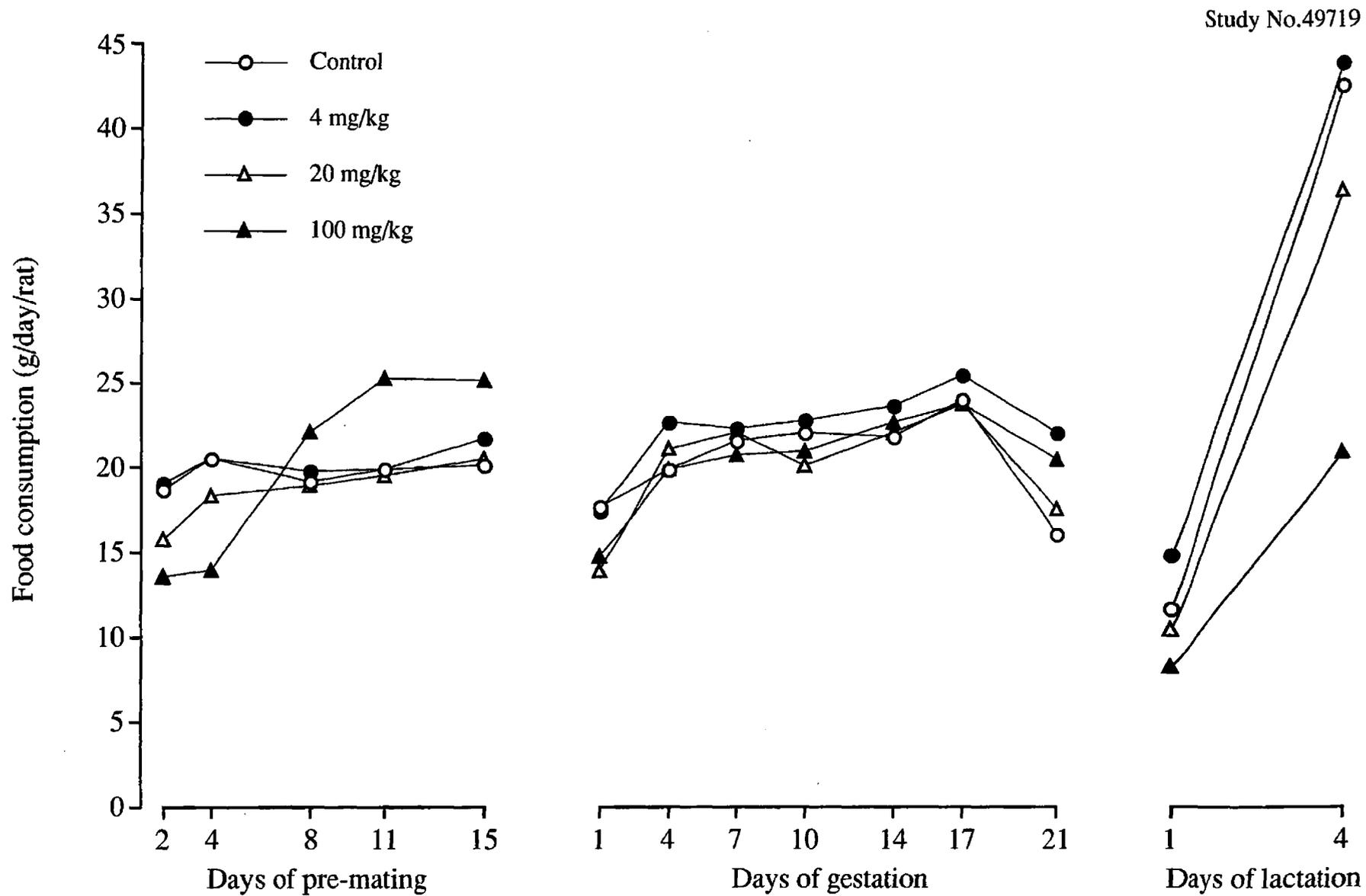


Fig. 4 Mean food consumption of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

Table 1 Clinical signs of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
4 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	11	11	11
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Table 1 - continued      Clinical signs of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment																				
		23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
4 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1 - continued Clinical signs of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment					
		44	45	46	47	48	49
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12
4 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11	11
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0

Table 2 Clinical signs of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of pre-mating														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
4 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Integumentary mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of mating											
		16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Control	Number of examined	11	8	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	No abnormality	11	8	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4 mg/kg	Number of examined	9	7	4									
	No abnormality	9	7	4									
20 mg/kg	Number of examined	5	4	1									
	No abnormality	5	4	1									
100 mg/kg	Number of examined	11	8	7	1								
	No abnormality	11	8	7	1								
	Integumentary mass	0	0	0	0								
	Dead	0	0	0	0								

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days 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
Control	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3
4 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	1
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	1
100 mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	4
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3
	Integumentary mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Table 2 - continued      Clinical signs of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of lactation				
		0	1	2	3	4
Control	Number of examined	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11
4 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	11	10	10
	No abnormality	12	12	11	10	10
100 mg/kg	Number of examined	10	10	4	4	3
	No abnormality	9	9	3	3	2
	Integumentary mass	1	1	1	1	1
	Dead	0	0	0	0	0

All newborns from 2 dams of 20 mg/kg group and 7 dams of 100 mg/kg group died until day 3 of lactation, and so these dams were sacrificed immediately.

Table 3 Body weights of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
	Body weight (g)			
Days of treatment				
1	390.8 ± 19.8 (12)	387.1 ± 17.9 (12)	387.1 ± 14.8 (12)	387.4 ± 18.4 (12)
4	405.1 ± 22.2 (12)	402.8 ± 20.4 (12)	396.0 ± 16.2 (12)	380.1 ± 17.2** (12)
8	418.5 ± 23.5 (12)	413.8 ± 24.7 (12)	403.1 ± 19.7 (12)	382.6 ± 23.3** (12)
11	430.3 ± 25.4 (12)	426.5 ± 27.8 (12)	411.8 ± 22.6 (12)	386.0 ± 27.0** (12)
15	439.9 ± 26.2 (12)	435.6 ± 30.4 (12)	420.4 ± 21.6 (12)	390.9 ± 30.3** (12)
18	443.7 ± 28.2 (12)	439.8 ± 31.4 (12)	423.5 ± 21.4 (12)	389.1 ± 35.1** (12)
22	456.7 ± 29.4 (12)	456.0 ± 34.2 (12)	439.0 ± 20.4 (12)	407.4 ± 31.4** (11)
25	465.9 ± 31.7 (12)	466.0 ± 36.1 (12)	446.4 ± 20.4 (12)	415.1 ± 34.1** (11)
29	476.6 ± 35.1 (12)	477.6 ± 38.5 (12)	457.4 ± 23.1 (12)	421.6 ± 36.5** (11)
32	491.7 ± 35.6 (12)	492.3 ± 40.4 (12)	467.3 ± 25.7 (12)	430.6 ± 37.2** (11)
36	498.7 ± 37.3 (12)	498.2 ± 43.7 (12)	469.3 ± 25.1 (12)	430.9 ± 39.8** (11)
39	504.8 ± 38.5 (12)	506.8 ± 47.9 (12)	477.6 ± 28.1 (12)	434.3 ± 36.9** (11)
43	517.2 ± 36.5 (12)	516.5 ± 50.4 (12)	486.1 ± 30.0 (12)	438.3 ± 38.4** (11)
46	526.1 ± 37.6 (12)	527.3 ± 53.4 (12)	491.9 ± 31.5 (12)	439.4 ± 38.3** (11)
49	534.4 ± 39.0 (12)	528.7 ± 53.2 (12)	492.7 ± 33.2* (12)	433.5 ± 38.9** (11)
Total body weight gain	143.6 ± 29.6 (12)	141.6 ± 42.1 (12)	105.5 ± 21.6* (12)	44.2 ± 28.8** (11)

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  (significantly different from control).

Values are mean ± S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 100 mg/kg group died on day 21 of treatment.

Table 4 Body weights of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
	Body weight (g)			
Days of pre-mating				
1	239.8 ± 9.4 (12)	239.0 ± 9.1 (12)	236.2 ± 10.4 (12)	236.2 ± 11.9 (12)
4	248.1 ± 9.5 (12)	245.1 ± 9.1 (12)	243.8 ± 10.2 (12)	232.5 ± 11.0** (12)
8	255.7 ± 10.6 (12)	252.4 ± 12.2 (12)	250.7 ± 11.1 (12)	242.5 ± 10.7* (12)
11	262.3 ± 10.2 (12)	258.6 ± 12.9 (12)	256.0 ± 11.7 (12)	253.6 ± 15.7 (12)
15	267.7 ± 9.9 (12)	265.8 ± 13.3 (12)	262.6 ± 13.4 (12)	258.4 ± 17.2 (12)
Days of gestation				
0	277.8 ± 14.6 (11)	272.2 ± 16.1 (12)	263.3 ± 11.6 (12)	258.2 ± 15.7** (11)
4	296.3 ± 13.4 (11)	292.3 ± 16.3 (12)	278.9 ± 9.6* (12)	273.5 ± 16.2** (11)
7	307.4 ± 15.1 (11)	305.6 ± 17.1 (12)	292.8 ± 11.4 (12)	281.1 ± 15.7** (11)
10	321.1 ± 15.2 (11)	316.8 ± 15.7 (12)	302.3 ± 10.7** (12)	288.6 ± 15.8** (11)
14	340.6 ± 17.9 (11)	336.2 ± 15.8 (12)	322.1 ± 11.7* (12)	304.1 ± 15.5** (11)
17	371.2 ± 19.1 (11)	365.9 ± 20.4 (12)	346.8 ± 10.3** (12)	327.8 ± 19.6** (11)
21	421.3 ± 22.4 (11)	423.9 ± 21.4 (12)	392.8 ± 16.8** (12)	380.0 ± 23.2** (11)
Days of lactation				
0	301.6 ± 29.0 (11)	299.9 ± 18.8 (12)	287.7 ± 25.5 (12)	287.1 ± 19.1 (10)
4	328.6 ± 22.8 (11)	328.6 ± 19.6 (12)	312.6 ± 13.5 (10)	291.7 ± 5.6* (3)

\*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01 (significantly different from control).

Values are mean ± S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

Each 1 animal of control and 100 mg/kg groups were non-pregnant.

One dam of 100 mg/kg group died on day 22 of gestation.

All newborns from 2 dams of 20 mg/kg group and 7 dams of 100 mg/kg group died until day 3 of lactation, and so these dams were sacrificed immediately.

Table 5 Food consumption of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
	Food consumption (g/day/rat)			
Days of treatment				
2	28.5 ± 3.0 (12)	27.2 ± 2.9 (12)	23.1 ± 2.9** (12)	18.9 ± 2.9** (12)
4	29.3 ± 3.1 (12)	28.6 ± 2.9 (12)	26.9 ± 1.9 (12)	19.8 ± 1.6** (12)
8	28.4 ± 3.6 (12)	27.1 ± 3.1 (12)	26.0 ± 2.8 (12)	27.4 ± 2.6 (12)
11	28.9 ± 2.8 (12)	29.3 ± 4.2 (12)	26.7 ± 2.7 (12)	26.7 ± 3.1 (12)
15	28.1 ± 2.5 (12)	27.8 ± 3.2 (12)	25.8 ± 2.4 (12)	28.5 ± 4.1 (12)
30	29.8 ± 2.7 (12)	28.9 ± 3.8 (12)	26.8 ± 3.0 (12)	28.4 ± 2.9 (11)
32	30.0 ± 3.2 (12)	29.6 ± 3.0 (12)	26.9 ± 2.5* (12)	27.7 ± 2.6 (11)
36	29.6 ± 2.7 (12)	28.8 ± 3.6 (12)	24.6 ± 3.3** (12)	28.3 ± 4.3 (11)
39	28.2 ± 3.4 (12)	28.6 ± 4.5 (12)	26.4 ± 3.1 (12)	28.3 ± 3.1 (11)
43	28.9 ± 2.6 (12)	28.6 ± 3.7 (12)	26.2 ± 2.9 (12)	26.9 ± 2.9 (11)
46	29.4 ± 4.0 (12)	30.0 ± 4.9 (12)	27.2 ± 3.0 (12)	25.7 ± 2.2 (11)
49	30.7 ± 2.9 (12)	28.0 ± 3.8 (12)	24.7 ± 2.4** (12)	24.1 ± 4.7** (11)

\* : P < 0.05, \*\* : P < 0.01 (significantly different from control).

Values are mean ± S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 100 mg/kg group died on day 21 of treatment.

Table 6 Food consumption of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
Food consumption (g/day/rat)				
Days of pre-mating				
2	18.6±1.9 (12)	19.0±2.1 (12)	15.7±2.9* (12)	13.5±3.5** (12)
4	20.4±2.3 (12)	20.4±2.7 (12)	18.2±2.1 (12)	13.9±2.4** (12)
8	19.1±3.0 (12)	19.7±2.6 (12)	18.9±2.5 (12)	22.1±2.6* (12)
11	19.8±3.2 (12)	19.8±2.3 (12)	19.5±2.1 (12)	25.2±4.7** (12)
15	20.1±3.2 (12)	21.7±1.9 (12)	20.4±1.7 (12)	25.1±3.4** (12)
Days of gestation				
1	17.6±4.0 (11)	17.4±4.4 (12)	13.9±3.8 (12)	14.7±3.7 (11)
4	19.8±3.5 (11)	22.7±2.4 (12)	21.1±2.7 (12)	19.9±2.5 (11)
7	21.5±2.4 (11)	22.3±2.5 (12)	22.0±2.9 (12)	20.7±2.5 (11)
10	22.1±2.5 (11)	22.8±2.1 (12)	20.1±3.0 (12)	21.0±2.7 (11)
14	21.8±2.4 (11)	23.6±1.6 (12)	22.0±2.0 (12)	22.6±2.7 (11)
17	24.0±1.9 (11)	25.5±2.2 (12)	23.7±2.3 (12)	23.7±3.8 (11)
21	16.1±6.1 (11)	22.1±3.4* (12)	17.5±6.7 (12)	20.5±6.2 (11)
Days of lactation				
1	11.7±5.6 (11)	14.8±6.4 (12)	10.4±6.6 (12)	8.3±3.2 (10)
4	42.7±5.2 (11)	44.0±4.9 (12)	36.5±4.1* (10)	21.0±2.4** (3)

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

Each 1 animal of control and 100 mg/kg groups were non-pregnant.

One dam of 100 mg/kg group died on day 22 of gestation.

All newborns from 2 dams of 20 mg/kg group and 7 dams of 100 mg/kg group died until day 3 of lactation, and so these dams were sacrificed immediately.

Table 7 Hematological findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
No. of animals	12	12	12	11
Leucocyte (10 <sup>2</sup> /μl)	79±13	80±16	74±15	71±16
Erythrocyte (10 <sup>4</sup> /μl)	886±33	882±46	854±38	816±62**
Hemoglobin (g/dl)	15.0±0.7	15.2±0.6	15.0±0.6	14.6±0.9
Hematocrit (%)	47.8±1.9	48.2±2.3	47.4±2.0	44.8±3.2*
Platelet (10 <sup>4</sup> /μl)	99.6±8.0	102.7±12.3	97.6±9.9	94.3±8.8
MCV (fl)	54±2	55±1	56±1	55±2
MCH (pg)	16.9±0.7	17.2±0.5	17.6±0.5*	17.9±0.6**
MCHC (%)	31.4±0.4	31.5±0.5	31.6±0.6	32.5±0.5**
Reticulocyte (%)	32±4	31±3	33±3	43±9**
Prothrombin time (sec)	14.3±2.0	13.8±2.1	13.0±1.4	12.8±0.9
APTT (sec)	24.8±1.8	23.8±4.1	24.0±3.5	23.0±2.8
Fibrinogen (mg/dl)	220.8±13.2	223.5±20.7	214.5±16.1	204.9±15.0

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

Values are mean ± S.D.

Table 8 Biochemical findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
No. of animals	12	12	12	11
T. protein (g/dl)	5.5±0.2	5.5±0.3	5.4±0.3	5.5±0.3
Albumin (g/dl)	3.6±0.1	3.6±0.2	3.6±0.1	3.9±0.2**
A/G ratio	1.87±0.22	2.00±0.20	2.06±0.19	2.61±0.52**
GOT (IU/l)	105±18	98±20	94±13	139±39**
GPT (IU/l)	29±7	24±5	23±3*	55±47**
γ-GTP (IU/l)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
ALP (IU/l)	184±10	178±34	169±22*	160±29
T. cholesterol (mg/dl)	47±10	51±13	54±9	61±10*
Triglycerides (mg/dl)	30±11	26±14	28±9	13±5**
Phospholipids (mg/dl)	87±14	91±19	91±13	103±13*
T. bilirubin (mg/dl)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.1**
Glucose (mg/dl)	102±14	105±19	104±13	100±11
BUN (mg/dl)	17.6±4.0	16.7±1.6	16.1±2.2	18.6±2.6
Creatinine (mg/dl)	0.5±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1*	0.4±0.1
IP (mg/dl)	6.4±0.5	6.7±0.6	6.8±0.5	6.7±0.5
Ca (mg/dl)	9.9±0.2	10.0±0.3	10.0±0.4	9.9±0.3
Na (mEq/l)	146.8±0.9	147.1±0.8	146.5±0.8	145.5±1.6*
K (mEq/l)	4.30±0.18	4.32±0.18	4.30±0.21	3.97±0.22**
Cl (mEq/l)	106.4±1.1	105.9±1.4	106.2±1.9	105.4±1.7

\* : P&lt;0.05, \*\* : P&lt;0.01 (significantly different from control).

Values are mean ± S. D.

Table 9 Necropsy findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose		Control	4 mg/kg	20 mg/kg
	Number of animals		<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Terminal sacrifice</u>
			12	12	12
Digestive system					
Stomach					
Spots, dark red, mucosa, glandular stomach			0	0	0
Small intestine					
Dilatation, ileum			0	0	0
Large intestine					
Dilatation, cecum			0	0	0
Hematopoietic system					
Thymus					
Atrophy			0	0	0
Coloration, dark red			0	0	0
Spleen					
Atrophy			0	0	0
Genital system					
Testis					
Atrophy			2	0	0
Epididymis					
Nodule, light gray			1	1	0
Atrophy			1	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 9 - continued Necropsy findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	100 mg/kg		
		Terminal sacrifice	Dead	Total
		11	1	12
Digestive system				
Stomach				
Spots, dark red, mucosa, glandular stomach		0	1	1
Small intestine				
Dilatation, ileum		0	1	1
Large intestine				
Dilatation, cecum		0	1	1
Hematopoietic system				
Thymus				
Atrophy		0	1	1
Coloration, dark red		0	1	1
Spleen				
Atrophy		0	1	1
Genital system				
Testis				
Atrophy		0	0	0
Epididymis				
Nodule, light gray		2	0	2
Atrophy		0	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 10 Necropsy findings of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control			4 mg/kg
		<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Imminent sacrifice</u>	<u>Total</u>	<u>Terminal sacrifice</u>
		11	1 <sup>a)</sup>	12	12
Digestive system					
Stomach					
Spots, dark red, mucosa, glandular stomach		0	0	0	0
Distention, watery content		0	0	0	0
Hematopoietic system					
Spleen					
Atrophy		0	0	0	0
Urinary system					
Kidney					
Macule, light gray		0	0	0	0
Integumentary system					
Subcutis					
Mass, light gray		0	0	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

a) One animal was non-pregnant.

Table 10 - continued Necropsy findings of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	20 mg/kg			100 mg/kg		
		Terminal sacrifice	Imminent sacrifice	Total	Terminal sacrifice	Imminent sacrifice/Dead	Total
		10	2 <sup>a)</sup>	12	3	9 <sup>b)</sup>	12
Digestive system							
Stomach							
Spots, dark red, mucosa, glandular stomach		0	0	0	0	1	1
Distention, watery content		0	0	0	0	1	1
Hematopoietic system							
Spleen							
Atrophy		0	0	0	0	1	1
Urinary system							
Kidney							
Macule, light gray		0	0	0	1	0	1
Integumentary system							
Subcutis							
Mass, light gray		0	0	0	1	0	1

No appreciable changes in all other organs and tissues.

a) Two animals were imminently sacrificed due to death of all newborns.

b) One animal was dead. Seven animals were imminently sacrificed due to death of all newborns. One animal was non-pregnant.

Table 11 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
No. of animals	12	12	12	11
Absolute organ weight				
Final Body Weight (g)	501.5±38.4	498.5±47.1	462.1±29.1*	400.3±35.7**
Brain (g)	2.18±0.08	2.24±0.10	2.17±0.07	2.09±0.11
Heart (g)	1.62±0.19	1.62±0.16	1.61±0.12	1.54±0.16
Lungs (g)	1.48±0.10	1.55±0.16	1.51±0.16	1.41±0.13
Thymus (g)	0.31±0.10	0.30±0.06	0.31±0.09	0.20±0.09**
Liver (g)	13.02±1.76	12.31±1.74	12.00±1.16	13.36±1.52
Spleen (g)	0.88±0.13	0.82±0.13	0.79±0.11	0.70±0.08**
Kidneys (g)	3.18±0.31	3.14±0.32	3.24±0.41	3.07±0.28
Adrenals (mg)	58.8±7.9	68.2±12.3*	64.8±8.1	74.9±7.9**
Testes (g)	3.17±0.64	3.40±0.23	3.51±0.32	3.58±0.36
Epididymides (g)	1.29±0.18	1.35±0.13	1.38±0.09	1.25±0.18
Relative organ weight				
Brain (g/100g B.W.)	0.44±0.04	0.45±0.04	0.47±0.02	0.53±0.05**
Heart (g/100g B.W.)	0.32±0.03	0.32±0.02	0.35±0.03	0.39±0.04**
Lungs (g/100g B.W.)	0.30±0.03	0.31±0.02	0.33±0.02*	0.35±0.03**
Thymus (g/100g B.W.)	0.06±0.02	0.06±0.01	0.07±0.02	0.05±0.02
Liver (g/100g B.W.)	2.58±0.17	2.46±0.14	2.60±0.17	3.33±0.19**
Spleen (g/100g B.W.)	0.18±0.02	0.16±0.02	0.17±0.02	0.18±0.02
Kidneys (g/100g B.W.)	0.64±0.04	0.63±0.04	0.70±0.06**	0.77±0.04**
Adrenals (mg/100g B.W.)	11.8±2.0	13.7±2.2	14.1±1.9*	18.9±2.8**
Testes (g/100g B.W.)	0.63±0.13	0.69±0.08	0.76±0.08**	0.90±0.11**
Epididymides (g/100g B.W.)	0.26±0.03	0.27±0.03	0.30±0.02**	0.31±0.04**

\* : P&lt;0.05, \*\* : P&lt;0.01 (significantly different from control).

Values are mean ±S.D.

Table 12 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
No. of animals	11	12	10	3
Absolute organ weight				
Final Body Weight (g)	328.6 ± 22.8	328.6 ± 19.6	312.6 ± 13.5	291.7 ± 5.6*
Brain (g)	2.11 ± 0.08	2.12 ± 0.08	2.14 ± 0.14	2.10 ± 0.15
Heart (g)	1.06 ± 0.05	1.05 ± 0.09	0.94 ± 0.11**	0.97 ± 0.04
Lungs (g)	1.17 ± 0.05	1.17 ± 0.08	1.14 ± 0.08	1.09 ± 0.06
Thymus (g)	0.19 ± 0.09	0.20 ± 0.07	0.20 ± 0.11	0.26 ± 0.15
Liver (g)	13.11 ± 1.31	13.26 ± 1.41	12.05 ± 0.90	12.07 ± 1.62
Spleen (g)	0.68 ± 0.09	0.72 ± 0.12	0.61 ± 0.08	0.60 ± 0.06
Kidneys (g)	2.07 ± 0.20	2.06 ± 0.14	2.06 ± 0.14	2.12 ± 0.32
Adrenals (mg)	75.8 ± 9.0	77.2 ± 11.3	77.3 ± 4.3	73.7 ± 6.3
Ovaries (mg)	101.7 ± 13.2	106.0 ± 14.9	102.2 ± 16.6	109.8 ± 9.8
Relative organ weight				
Brain (g/100g B.W.)	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.72 ± 0.06*
Heart (g/100g B.W.)	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.03*	0.33 ± 0.01
Lungs (g/100g B.W.)	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.03
Thymus (g/100g B.W.)	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.09 ± 0.05
Liver (g/100g B.W.)	3.99 ± 0.35	4.03 ± 0.31	3.86 ± 0.32	4.14 ± 0.50
Spleen (g/100g B.W.)	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02
Kidneys (g/100g B.W.)	0.63 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.66 ± 0.04	0.73 ± 0.12
Adrenals (mg/100g B.W.)	23.1 ± 3.0	23.5 ± 2.9	24.8 ± 1.7	25.3 ± 2.7
Ovaries (mg/100g B.W.)	31.1 ± 4.7	32.3 ± 4.3	32.7 ± 4.4	37.7 ± 4.1

\* : P&lt;0.05, \*\* : P&lt;0.01 (significantly different from control).

Values are mean ± S.D.

Table 13A Histopathological findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control				4mg/kg				20mg/kg				100mg/kg											
		Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice											
		12				12				12				11											
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	Total 12							
Digestive system																									
Liver																									
		(12)				(0)				(12)				(11)				(1)				(12)			
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular		12	0	0	0					12	0	0	0	6	5	0	0	1	0	0	0	7	5	0	0
Stomach																									
		(0)				(0)				(0)				(0)				(1)				(1)			
Erosion, glandular stomach														0	1	0	0					0	1	0	0
Small intestine																									
		(0)				(0)				(0)				(0)				(1)				(1)			
Cellular infiltration, neutrophil, ileum														0	1	0	0					0	1	0	0
Granulation, ileum														0	1	0	0					0	1	0	0
Respiratory system																									
Lung																									
		(12)				(0)				(12)				(11)				(1)				(12)			
Edema		12	0	0	0					12	0	0	0	11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0
Hematopoietic system																									
Thymus																									
		(12)				(0)				(12)				(11)				(1)				(12)			
Atrophy		12	0	0	0					12	0	0	0	11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0
Hemorrhag		12	0	0	0					12	0	0	0	11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0
Spleen																									
		(12)				(0)				(12)				(11)				(1)				(12)			
Atrophy		12	0	0	0					12	0	0	0	11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0
Genital system																									
Testis																									
		(12)				(0)				(0)				(11)				(1)				(12)			
Atrophy		10	2	0	0									11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Epididymis																									
		(12)				(1)				(0)				(11)				(1)				(12)			
Granuloma, spermatic		11	1	0	0	0	1	0	0					9	3	0	0	1	0	0	0	9	3	0	0
Decrease, sperm		11	0	0	1	1	0	0	0					12	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Cell debris lumen		11	1	0	0	1	0	0	0					12	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

There are no remarkable changes in the heart, kidney, adrenal and brain of all animals in control and 100 mg/kg groups, and large intestine of one animal in 100 mg/kg group.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 13B Histopathological findings of male rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control	4mg/kg	20mg/kg	100mg/kg	Total
		Terminal sacrifice	Terminal sacrifice	Terminal sacrifice	Terminal sacrifice dead	
		12	1	12	11	12
Digestive system						
Liver		(12)	(0)	(12)	(11)	(12)
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular		0		0	5	5
Stomach		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)
Erosion, glandular stomach					1	1
Small intestine		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)
Cellular infiltration, neutrophil, ileum					1	1
Granulation, ileum					1	1
Respiratory system						
Lung		(12)	(0)	(12)	(11)	(12)
Edema		0		0	0	1
Hematopoietic system						
Thymus		(12)	(0)	(12)	(11)	(12)
Atrophy		0		0	0	1
Hemorrhage		0		0	0	1
Spleen		(12)	(0)	(12)	(11)	(12)
Atrophy		0		0	0	1
Genital system						
Testis		(12)	(0)	(0)	(11)	(12)
Atrophy		2			0	0
Epididymis		(12)	(1)	(0)	(11)	(12)
Granuloma, spermatic		1	1		3	3
Decrease, sperm		1	1		0	0
Cell debris, lumen		1	1		0	0

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

There are no remarkable changes in the heart, kidney, adrenal and brain of all animals in control and 100 mg/kg groups, and large intestine of one animal in 100 mg/kg group.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 14A Histopathological findings of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control												20 mg/kg												
		Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead				Total				Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead				Total				
		11				1 <sup>a)</sup>				12				10				2 <sup>b)</sup>				12				
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++		
Digestive system																										
Liver																										
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular																										
	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0	10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0		
Stomach																										
Erosion, glandular stomach																										
Respiratory system																										
Lung																										
Edema																										
	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0	10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0		
Hematopoietic system																										
Thymus																										
Atrophy																										
	10	1	0	0	1	0	0	0	11	1	0	0	9	1	0	0	0	2	0	0	9	3	0	0		
Spleen																										
Atrophy																										
	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0	10	0	0	0	2	0	0	0	12	0	0	0		
Urinary system																										
Kidney																										
Basophilic tubules																										
Proliferation, transitional epithelium																										
	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0														
Genital system																										
Mammary gland																										
Adenocarcinoma																										
Endocrine system																										
Adrenal																										
Necrosis, zona fasciculata to zona reticularis																										
	11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0														

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

There are no remarkable changes in the heart, ovary and brain of all animals in control.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

a) One animal was non-pregnant.

b) Two animals were imminently sacrificed due to death of all newborns.

Table 14A - continued Histopathological findings of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	100 mg/kg											
		Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead				Total			
		3				9 <sup>a)</sup>				12			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Digestive system													
Liver		( 3)				( 9)				(12)			
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular		2	1	0	0	3	6	0	0	5	7	0	0**
Stomach		( 0)				( 1)				( 1)			
Erosion, glandular stomach						0	1	0	0	0	1	0	0
Respiratory system													
Lung		( 3)				( 9)				(12)			
Edema		3	0	0	0	8	0	1	0	11	0	1	0
Hematopoietic system													
Thymus		( 3)				( 9)				(12)			
Atrophy		3	0	0	0	8	1	0	0	11	1	0	0
Spleen		( 3)				( 9)				(12)			
Atrophy		3	0	0	0	8	1	0	0	11	1	0	0
Urinary system													
Kidney		( 3)				( 9)				(12)			
Basophilic tubules		2	1	0	0	9	0	0	0	11	1	0	0
Proliferation, transitional epithelium		3	0	0	0	8	1	0	0	11	1	0	0
Genital system													
Mammary gland		( 1)				( 0)				( 1)			
Adenocarcinoma		0	1	0	0					0	1	0	0
Endocrine system													
Adrenal		( 3)				( 9)				(12)			
Necrosis, zona fasciculata to zona reticularis		3	0	0	0	8	1	0	0	11	1	0	0

\*\* : P<0.01 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

There are no remarkable changes in the heart, ovary and brain of all animals in 100 mg/kg group.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

a) One animal was dead. Seven animals were imminently sacrificed due to death of all newborns. One animal was non-pregnant.

Table 14B Histopathological findings of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control			20 mg/kg		
		Terminal sacrifice	Imminent sacrifice/Dead	Total	Terminal sacrifice	Imminent sacrifice/Dead	Total
		11	1 <sup>a)</sup>	12	10	2 <sup>b)</sup>	12
Digestive system							
Liver		(11)	( 1)	(12)	(10)	( 2)	(12)
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular		0	0	0	0	0	0
Stomach		( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
Erosion, glandular stomach							
Respiratory system							
Lung		(11)	( 1)	(12)	(10)	( 2)	(12)
Edema		0	0	0	0	0	0
Hematopoietic system							
Thymus		(11)	( 1)	(12)	(10)	( 2)	(12)
Atrophy		1	0	1	1	2	3
Spleen		(11)	( 1)	(12)	(10)	( 2)	(12)
Atrophy		0	0	0	0	0	0
Urinary system							
Kidney		(11)	( 1)	(12)	( 0)	( 0)	( 0)
Basophilic tubules		0	0	0			
Proliferation, transitional epithelium		0	0	0			
Genital system							
Mammary gland		( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
Adenocarcinoma							
Endocrine system							
Adrenal		(11)	( 1)	(12)	( 0)	( 0)	( 0)
Necrosis, zona fasciculata to zona reticularis		0	0	0			

There are no remarkable changes in the heart, ovary and brain of all animals in control.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

a) One animal was non-pregnant.

b) Two animals were imminently sacrificed due to death of all newborns.

Table 14B - continued Histopathological findings of female rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	100 mg/kg		Total
		Terminal sacrifice	Imminent sacrifice/Dead	
		3	9 <sup>a)</sup>	12
Digestive system				
Liver		( 3)	( 9)	(12)
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular		1	6	7**
Stomach		( 0)	( 1)	( 1)
Erosion, glandular stomach			1	1
Respiratory system				
Lung		( 3)	( 9)	(12)
Edema		0	1	1
Hematopoietic system				
Thymus		( 3)	( 9)	(12)
Atrophy		0	1	1
Spleen		( 3)	( 9)	(12)
Atrophy		0	1	1
Urinary system				
Kidney		( 3)	( 9)	(12)
Basophilic tubules		1	0	1
Proliferation, transitional epithelium		0	1	1
Genital system				
Mammary gland		( 1)	( 0)	( 1)
Adenocarcinoma		1		1
Endocrine system				
Adrenal		( 3)	( 9)	(12)
Necrosis, zona fasciculata to zona reticularis		0	1	1

\*\* : P<0.01 (significantly different from control).

There are no remarkable changes in the heart, ovary and brain of all animals in 100 mg/kg group.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

a) One animal was dead. Seven animals were imminently sacrificed due to death of all newborns. One animal was non-pregnant.

Table 15 Reproductive performance of rats treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
No. of females examined	12	12	12	12
Count of estrus <sup>a)</sup>	3.83±0.39	3.67±0.49	3.58±0.51	3.17±1.19
Estrous cycle <sup>b)</sup>	4.08±0.29	4.19±0.58	4.29±0.40	3.98±0.39
No. of mated				
Male	12	12	12	12
Female	12	12	12	12
No. of copulated <sup>c)</sup>				
Male	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)
Female	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)
No. of impregnated <sup>d)</sup>	11 (91.67)	12 (100)	12 (100)	11 (91.67)
No. of pregnant <sup>d)</sup>	11 (91.67)	12 (100)	12 (100)	11 (91.67)
Duration of mating <sup>b)</sup>	3.67±3.08	2.67±1.23	1.83±1.11	3.25±1.22

Not significantly different from control.

a) Values are mean ±S.D.

b) Values are mean ±S.D. (day).

c) Values in parentheses represent percentages to the number of mated.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of copulated.

Table 16 Findings of delivery of F<sub>0</sub> dams treated orally with 2,4-diamino-6-phenyl-s-triazine and observations on their offspring in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
No. of dams	11	12	12	10
Gestational days <sup>a)</sup>	22.27±0.47	22.50±0.52	22.08±0.29	22.30±0.48
No. of corpora lutea <sup>b)</sup>	190 (17.27±2.76)	199 (16.58±1.16)	195 (16.25±2.01)	170 (17.00±2.21)
No. of implantations <sup>b)</sup>	179 (16.27±2.76)	191 (15.92±1.83)	183 (15.25±2.96)	164 (16.40±2.37)
No. of litter <sup>b)</sup>	170 (15.45±3.14)	177 (14.75±1.66)	165 (13.75±3.70)	152 (15.20±2.25)
Gestation index <sup>c)</sup>	100	100	100	100
No. of stillborns <sup>d)</sup>				
Male	0	1	2	23
Female	0	3	2	20
Total	0	4 (2.26) *	4 (2.42)	43 (28.29) **
No. of live newborns <sup>b)</sup>	170 (15.45±3.14)	173 (14.42±1.62)	161 (13.42±3.45)	109 (10.90±5.07)
Birth index <sup>e)</sup>	94.97	90.58	87.98	66.46*
Sex ratio of live newborns <sup>f)</sup>	0.87 (79/91)	0.90 (82/91)	0.96 (79/82)	0.98 (54/55)
Body weight of live newborns (g) <sup>g)</sup>				
Male On day 0	6.3±0.7	6.8±0.5	6.2±0.6	5.1±0.6**
4	9.6±1.5	10.6±0.9	9.9±1.5	6.8±1.2**
Female On day 0	6.0±0.6	6.5±0.4	5.8±0.6	4.7±0.6**
4	9.2±1.6	10.1±0.8	9.3±1.0	5.8±1.3**
Viability index <sup>h)</sup>	99.41	99.42	75.78*	11.93**
No. of external anomalies	0	0	0	0

\* : P<0.05, \*\* : P<0.01 (significantly different from control).

a) Values are mean ± S. D. (day).

b) Values in parentheses represent mean ± S. D.

c) Gestation index = (Number of dams with live newborns/Number of pregnant females) × 100.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of litter.

e) Birth index = (Number of live newborns/Number of implantations) × 100.

f) Values in parentheses represent the number of male/female live newborns.

g) Values are mean ± S. D.

h) Viability index = (Number of live newborns on day 4 after birth/Number of live newborns) × 100.