

食薬セ研第10-1636号

2000年 9月 4日

2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸の
ラットを用いる経口投与一世代生殖毒性試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【 目 次 】

要 約 -----	1
I . 親動物-----	1
1 . 雄動物所見 -----	1
2 . 雌動物所見 -----	1
3 . 生殖関連所見 -----	2
4 . 解剖時検査所見 -----	2
II . 出生児-----	3
1 . 生存性および発育に関する所見 -----	3
2 . 形態観察所見 -----	3
III . 評価 -----	3
緒 言 -----	4
試験材料および方法 -----	5
1 . 被験物質-----	5
2 . 使用動物および飼育条件 -----	5
3 . 群分けおよび個体識別 -----	6
4 . 投与検体の調製-----	6
5 . 投与量、群構成、投与期間および投与方法 -----	7
6 . 観察方法-----	8
7 . 統計解析-----	13
結 果 -----	14
I . 親動物-----	14
1 . 一般状態 -----	14
2 . 体重 -----	15
3 . 摂餌量-----	16
4 . 性周期-----	16

5. 交配成績-----	16
6. 分娩および哺育所見-----	17
7. 解剖時検査所見-----	17
II. 出生児-----	21
1. 一般状態および生存性-----	21
2. 体重-----	22
3. 形態観察所見-----	22
考 察-----	23
1. 親動物-----	23
2. 出生児-----	24
3. 無作用量-----	25
文 献-----	26

Figures (Figure 1 ~ Figure 4)

Tables (Table 1 ~ Table 20)

【 要 約 】

2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸（HNA と略記）の 0（媒体対照、0.5 %カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液）、12.5、50 および 200 mg/kg を Sprague-Dawley 系(Crj:CD) ラットの雌雄（各 25 匹／群）に、雄は 5 週齢から 10 週間、また、雌は 10 週齢から 2 週間経口投与し、3 週間を限度として交配させた。雄は、3 週間の交配期間終了後 1 週間を経過した後に剖検した。雌は、交配後、自然分娩させ、哺育 21 日に、出生児とともに剖検した。雌雄ともに剖検の前日まで投与を継続し、この間、親動物の一般状態、体重増加および摂餌量の変化などを観察するとともに、親動物の分娩および泌乳を含む繁殖能力、ならびに出生児の離乳までの発育を観察して、これらに対する HNA の影響を検討した。結果は、以下のように要約される。

I. 親動物

1. 雄動物所見

対照群の 1 例は、不整咬合による摂食不良によって瀕死となった。また、12.5 および 50 mg/kg 投与群の各 1 例は、骨髄性白血病により瀕死あるいは死亡となったが、いずれも HNA 投与に起因するものとは判断されなかった。その他の動物に、死亡あるいは瀕死は認められなかった。

HNA 投与に起因した一般状態の変化としては、200 mg/kg 投与群において投与後一過性の流涎および鼻汁が観察された。体重増加抑制は 200 mg/kg 投与群の投与末期に認められたが、摂餌量には投与の影響は認められなかった。50 mg/kg 以下の投与群には HNA 投与に起因した一般状態の変化ならびに体重増加および摂餌量の抑制は認められなかった。

2. 雌動物所見

死亡および瀕死動物は認められなかった。

HNA 投与に起因した一般状態の変化としては、200 mg/kg 投与群において投与後一過性の流涎が認められた。体重増加抑制は、200 mg/kg 投与群の投与初期ならびに妊娠末期か

ら分娩後の哺育中期までの間に認められたが、摂餌量には投与の影響は認められなかった。50 mg/kg 以下の投与群には HNA 投与に起因した一般状態の変化ならびに体重増加および摂餌量の抑制は認められなかった。

3. 生殖関連所見

性周期に HNA 投与に起因した異常は観察されず、全例が交尾し、受胎した。同居期間およびその間に回帰した発情の回数には HNA 投与の影響は認められなかった。また、分娩異常および哺育状態の異常も観察されず、出産率および妊娠期間にも HNA 投与の影響は認められなかった。しかし、200 mg/kg 投与群では出生児体重が低値で推移し、母動物の泌乳が抑制された可能性がある。

4. 解剖時検査所見

雄では、剖検時に実施した血液検査については、50 mg/kg 以上の投与群の赤血球数が増加した他に、HNA 投与に関連した変化は認められなかった。剖検では、200 mg/kg 投与群に前胃粘膜の肥厚領域が観察され、病理組織学検査では 50 mg/kg 以上の投与群に前胃粘膜扁平上皮の過形成が観察された。また、200 mg/kg 投与群では、肝臓における門脈周囲脂肪化の程度の減弱が認められた。肝臓については、剖検時に腫大も観察されたが、腫大に関連した明瞭な組織変化は観察されなかった。骨髓、脾臓および副腎の病理組織学検査では、HNA 投与に起因した変化は観察されなかった。また、下垂体、精巣、精巣上体、凝固腺、精囊および前立腺についても HNA 投与に起因した変化はいずれの投与群にも認められなかった。12.5 mg/kg 投与群にはいずれの検査項目にも HNA 投与の影響は認められなかった。

雌の剖検では、前胃粘膜の肥厚領域が 200 mg/kg 投与群の 1 例に観察され、病理組織学検査では、前胃粘膜の扁平上皮の過形成が認められたが、副腎、下垂体、卵巣、子宮、子宮頸部および膣のいずれにも、HNA 投与に起因した変化は認められなかった。50 mg/kg 以下の投与群には HNA 投与の影響は認められなかった。

II. 出生児

1. 生存性および発育に関する所見

行動を含む一般状態ならびに生存性には HNA 投与の影響は認められなかった。

発育については、200 mg/kg 投与群の体重が雌雄ともに出生日から生後 21 日まで低値を示し、胎児期から哺育期に亘る発育抑制が認められた。50 mg/kg 以下の投与群に発育抑制は認められなかった。

2. 形態観察所見

死亡児あるいは生存産児の剖検において、曲尾、短尾、短曲尾あるいは小眼といった外表奇形を有するものの頻度が 200 mg/kg 投与群においてやや増加した。200 mg/kg 投与群では、精巣の位置異常および脾臓の低形成、横隔膜ヘルニアの内臓奇形も認められた。これらの奇形の発現は特定の腹に偏って認められたが、本試験の結果からは HNA の催奇形性を否定はできなかった。

III. 評価

以上の試験成績から、本試験条件下では、HNA の無作用量は、生殖に関しては、雄では 200 mg/kg/day と推定される。雌および出生児では、出生児の体重に抑制が認められたことから 50 mg/kg/day であると推定される。生殖以外の一般項目については、体重増加抑制および前胃粘膜扁平上皮の過形成が観察されたことから、雄では 12.5 mg/kg/day であり、雌では 50 mg/kg/day であると推定される。

【 緒 言 】

2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸は、芳香族炭化水素であり、そのナトリウム塩は、リボフラビンの溶剤などに使用されている¹⁾。

2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸の毒性に関しては、経口投与による LD₅₀値は、ラットでは 832 mg/kg であることが報告されている²⁾。また、マウスに対する LD₅₀値は、経口投与では 800 mg/kg であり³⁾、腹腔内投与では 100 mg/kg であること⁴⁾、ならびに腹腔内投与後に傾眠や運動失調といった麻酔作用の現れることが報告されている⁴⁾。一方、反復投与毒性に関しては、2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸を28日間反復投与すると、副腎の壊死が一部の動物に認められることが報告されている⁵⁾。2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸の生殖毒性に関する報告は乏しく、28日間反復投与後の病理組織学検査では、生殖器に異常のないことのみ確認されている⁶⁾。

今回、OECD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、OECD 化学物質試験法ガイドライン415/一世代生殖毒性試験（昭和58年5月26日）、および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第 233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸の一世代生殖毒性試験を行い、同化合物の、親動物の分娩および泌乳を含む繁殖能力、ならびに出生児の離乳までの発育に及ぼす影響について検討したので報告する。

【試験材料および方法】

1. 被験物質

2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸 (HNA と略記、CAS No.: 92-70-6、分子式: $C_{11}H_6O_3$ 、構造式: 下図、分子量: 188.18、英名: 2-hydroxy-3-naphthoic acid、融点: 222~224°C) は、芳香族炭化水素に属する化学物質である。

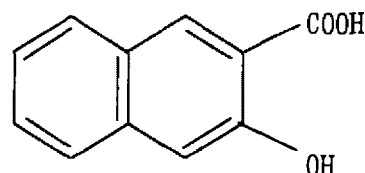


図. HNA の構造式

本試験には、
から提供された HNA (ロット番号:
純度: 99.2wt%、不純物として β -ナフトールを 0.1wt% 含有する黄色粉末) を使用した。提供された HNA は使用時まで室温保管した。本試験に使用した HNA については、投与終了後に
において再度分析した。その結果、純度に変化は認められず、試験期間中安定であったことが確認された。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー株式会社筑波飼育センター生産の Sprague-Dawley (SD) 系 (Crj:CD (SD) IGS, SPF) ラットを使用した。雄は 3 週齢で、また、雌は 6 週齢で購入し、入荷後 6 日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間毎日、一般状態を観察して異常が認められなかった動物を使用した。また、再交配用に同系統の 8 週齢の雌ラットを購入したが、再交配の必要は生じなかったため、試験には使用しなかった。動物の入荷、検疫ならびに群分け状況を、Table A に示した。

各動物は、基準温湿度各 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、および 50~65%、換気回数約 15 回/時間、照明 12 時間 (7 時~19 時点灯) に制御された飼育室 (17 号室) で、金属製金網床ケージ (220w × 270d × 190h mm) に個別に収容して飼育し、固型飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) および飲料水 (水道水、秦野市水道局給水) を自由に摂取させた。妊娠 14 日 (腔栓あるいは精子発見日 = 妊娠 0 日) 以後の母動物は、プラスチック製ラット用繁殖ケージ (350w ×

400d×180h mm)に収容し、剖検日まで紙パルプ製チップ (ALPHA-dri、加商株式会社) を床敷として供給して飼育した。

試験期間中、秦野研究所中央温湿度監視装置により測定した飼育室の温度および相対湿度は、空調機の洗浄作業時 (1999 年 5 月 27 日、9 時～10 時、湿度 78%) を除き、それぞれ、23.0～24.5 °C、および 58～70%であった。また、基準値からの逸脱も 1 時間以内に復し、試験に影響を及ぼさないものと判断された。使用した飼料、水および床敷についても試験に支障を来す可能性の考えられる混入物はなかった。

3. 群分けおよび個体識別

雄は投与開始前日の、雌は性周期観察開始前日の体重を基に体重別層化無作為抽出法に準じて群分けし、各群に雌雄各 25 匹を配した。群分け後、すべての雌雄は、尾に油性フェルトペンで個体識別番号を示す番号を記して個体を識別した。各飼育ケージには、試験計画番号および個体識別番号を記入した、群ごとに色の異なる動物カードを掛けて個体識別の補助とした。出生児については、生後 21 日に個体番号を示す番号を尾に記入して個体を識別した。

4. 投与検体の調製

投与検体は、各濃度毎に秤量した HNA に、媒体とした 0.5 %カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 (英名: 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution、略称: CMC Na) を加えて攪拌することにより懸濁して、いずれの用量においても 1 回の投与液量が 5 mL/kg 体重になるように含量を調製した。媒体として用いた CMC Na は、日局カルメロースナトリウム (丸石製薬株式会社、製造番号: 6Z09) を日局注射用水 (光製薬株式会社、製造番号: 9707SA) に溶解することにより調製した。

投与検体の安定性については、高速液体クロマトグラフ (分析カラム: Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d.×150 mm、粒子径 5μm、GL サイエンス)、移動相: 0.1%リン酸水溶液/アセトニトリル(50:50)、流速: 1.0 mL/min、カラム温度: 40°C付近の一定温度、測定波長: 235 nm、試料注入量: 10 μL) による HNA 量の測定により確認した。その結果、1 mg/mL お

よび 50 mg/mL の濃度の調製検体は、冷蔵および遮光条件下において 8 日間安定であることが確認されたので (Table B)、1 週間に 1 回以上の頻度で投与検体を調製し、冷蔵および遮光保管して調製後 7 日以内に使用した。また、同様の方法を用いて試験期間中に調製検体の均一性試験 (1 回) および含量測定 (2 回) を実施した結果、十分に攪拌した調製検体には所定量の HNA が均一に含まれていることが確認された (Tables C、D)。

5. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の投与量は、HNA のラットを用いる経口投与一世代生殖毒性試験 (投与量決定のための予備試験) (試験計画番号: R-98-010) の結果に基づいて決定した。すなわち、本試験と同系統のラット各群雌雄各 5 匹に、東京化成工業株式会社から購入した HNA (ロット番号: GG01) を CMC Na に懸濁して、0、8、40 あるいは 200 mg/kg を交配前 2 週間から反復経口投与して交配させた。これらの動物のうち、雌は妊娠 14 日に剖検して妊娠黄体数、着床数および胚の生存性を調べ、雄は 28 日反復投与翌日に剖検して精巣および前立腺腹葉重量を測定した。また、これらの群とは別に、雌 1 匹および雄 2 匹に 300 mg/kg を 2 週間反復投与した。その結果、300 mg/kg を投与しても雌は死亡しなかったが、雄では、1 例が投与 8 日に死亡し、他の 1 例も鎮静あるいは軟便など死亡例と類似した変化が認められた。200 mg/kg 投与群では、雌雄動物に自発運動の減少などの一般状態の変化ならびに胃辺縁部の粘膜肥厚が認められたが、体重増加および摂餌量の重篤な変化は認められず、器官重量および生殖能力にも異常は認められなかった。これらのことから、高用量には、雄を死亡させないと推測される 200 mg/kg を設定し、以下公比 4 で減じて、中用量には 50 mg/kg を、低用量には 12.5 mg/kg を設定した。

以下に群構成を示す。

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg)	匹数 (動物番号)	
			雄	雌
1	媒体対照 (CMC Na)	0	25 (MX01001-025)	25 (FB01001-025)
2	HNA	12.5	25 (MX02001-025)	25 (FB02001-025)
3	HNA	50	25 (MX03001-025)	25 (FB03001-025)
4	HNA	200	25 (MX04001-025)	25 (FB04001-025)

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前 10 週間から最長 3 週間の交配期間を経て剖

検前日に至るまでの連続 98 日間、また、雌に対しては交配前 2 週間、交尾までの交配期間、妊娠期間、哺育 20 日（分娩日＝哺育 0 日）まで毎日 1 回、調製検体をマグネティックスターラーで絶えず攪拌しながらラット用胃管を用いて経口投与した。

毎日の投与は、一定時刻の間（9 時～13 時）に行い、各動物の投与液量（5 mL/kg）は、雄および交配前、交配期間中の雌では週 1 回測定される体重を基準とし、交尾後の雌では妊娠 0（産栓あるいは精子発見日＝妊娠 0 日）、7、14、20 日の体重を、分娩後の雌では哺育 0、4、7、14 日の体重を基準にそれぞれ算出した。

6. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態の観察

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日 1 回以上観察した。投与期間中の動物については、投与前および投与終了後に観察した。死亡例については発見後直ちに剖検した。また、翌日まで生存の可能性が乏しいと判断された瀕死動物は、致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、後述の剖検の項に記載した方法に従って剖検した。

B. 体重測定

雄は全例について、週 1 回（投与 1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、92 日）および剖検日に測定した。

雌は全例について、交尾を確認するまでは週 1 回（投与 1、8、15、22 日）、交尾確認後は、妊娠 0、7、14、20 日に、分娩後は哺育 0、4、7、14、21 日に測定した。これらのうち、投与 22 日については、交尾が確認されていない動物についてのみ測定したので評価の対象から除外した。

C. 摂餌量測定

雄は全例について、投与 2～3、9～10、16～17、23～24、30～31、37～38、44～45、51～52、58～59、65～66、71～72、79～80、86～87 日に測定した。これらのうち、投与 79～80 日および 86～87 日については、交配期間中に当たり、飼育条件が動物により異なったため、評価の対象から除外した。

雌は全例について、交配前期間は投与 2～3 日および 9～10 日、交尾確認後は、妊娠 0～7、7～14、14～20 日に、分娩後は哺育 0～4、4～7、7～14、14～21 日に測定した。

D. 性周期

全例について投与開始 2 週間前から交配開始後、交尾確認日まで、膣スメア標本を作製して観察し、細胞構成から、発情期、発情前期および発情休止期に分類した。さらに、投与開始前 2 週間および投与開始後 2 週間の各時期について、発情期（発情期像が連続した場合は、最終日）から次回発情期を回帰するまでの日数を各動物について数え、平均発情回帰日数を算出するとともに、4 日で発情を回帰した動物の性周期は、4 日周期に、5 日で発情を回帰した動物の性周期は、5 日周期に、4 および 5 日の間隔が混在して認められたものは、4 および 5 日周期に、それ以外は不正性周期に分類した。

E. 交配

交配は、雄は 10 週間投与後(投与 71 日)から、雌は 2 週間投与後(投与 15 日)から、交尾を確認するまで、3 週間を限度として同群内の雌雄 1：1 で連日同居させることによって行った。交尾の確認は、膣スメア中の精子の存在および膣栓を毎朝確認することにより行い、いずれかが確認された日を妊娠 0 日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。

交配結果から、各群について交尾率〔(交尾動物数/同居動物数)×100〕、受胎率〔(妊娠動物数/交尾動物数)×100〕、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。なお、交配前期間中の死亡および瀕死剖検により、交配開始時に対照群、12.5 mg/kg および 50 mg/kg 投与群において各 1 例の雄動物が不足したため、これらの動物と交配を予定していた雌動物については交配開始日を投与 17 日に延期して、同群内の既に交尾が確認されている雄動物と交配させた。

F. 分娩・哺育状態の観察

各群とも、交尾した雌は、全例を自然分娩させて哺育させた。

分娩の確認は、妊娠 20 日から妊娠 25 日までの 9～11 時に行い、膣からの出血あるいは受胎産物の娩出といった分娩徴候の有無を観察した。分娩の直接観察が可能な例については分娩状態を観察した。直接観察ができなかった例については、分娩完了後の一般状態が

ら分娩困難の有無を判断して記録した。

分娩完了を確認した日を分娩日とし、それを哺育0日と規定して、分娩を確認した全例について、妊娠期間（妊娠0日～分娩日の日数）を算定し、出産率〔（生児出産雌数／妊娠動物数）×100〕を各群について求めた。また、哺育1日から毎日、哺育状態を観察した。

G. 剖検

イ. 雄動物

死亡・瀕死動物は、胸腹部主要器官について異常の有無を肉眼的に確認し、下垂体、胃、副腎、精巣、精巣上体、凝固腺、精囊、前立腺を含む胸腹部主要器官を摘出した。摘出した器官・組織のうち、精巣および精巣上体はブアン液で固定し（長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液）、その他は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定して保存した。これらのうち、異常の認められた器官・組織、および下垂体、胃、副腎、精巣、精巣上体、凝固腺、精囊および前立腺腹葉については、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン－エオジン染色を行って、病理組織標本作製し、全例について検査した。

投与 98 日まで生存した動物は、その翌日に全例を剖検した（定期解剖）。剖検に先立って、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈から抗凝固剤として EDTA-2K を用いて採血し、さらに放血・致死させて剖検した。剖検では、胸腹部主要器官の異常の有無を肉眼的に確認し、異常が観察された組織は、0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定して保存した。また、下垂体、胃、副腎、精巣、精巣上体、凝固腺、精囊および前立腺ならびに死亡および瀕死動物の剖検において異常が認められた骨髓、脾臓および肝臓についても摘出し、異常の有無を肉眼的に確認した後、精巣および精巣上体はブアン液で固定し（長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液）、その他は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定して保存した。これらのうち、異常の認められた組織については常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン－エオジン染色を行って病理組織標本作製し、検査した。また、全例について骨髓、脾臓、肝臓、下垂体、胃、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺腹葉および凝固腺の病理組織標本作製し、骨髓、脾臓および肝臓は全例について、その他の組織は対照群および高用量群の全例について検査した。胃に

については、高用量群において異常が観察されたため、中および低用量群についても追加観察した。

定期解剖時に得られた血液は、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス)を用いて、電気抵抗法により赤血球数および白血球数を自動測定した。また、血液塗抹標本を作製して Wright-Giemsa 染色を施し、光学顕微鏡下で白血球分類を視算した。これらの血液検査成績は、12.5 mg/kg および 50 mg/kg 投与群の死亡あるいは瀕死剖検例に認められた骨髄性白血病が、その他の動物にも発症しているかどうかを診断するための補助とした。

ロ. 雌動物

哺育 21 日に、致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で、放血により致死させ、剖検し、胸腹部主要器官の異常の有無を肉眼的に確認した。その際、異常が観察された組織は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定して保存した。また、子宮を摘出し、着床痕数を肉眼的に数えた後、0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定して保存した。この他に、下垂体、胃、副腎、卵巣、頸部および腔、ならびに死亡および瀕死動物の剖検時に異常の認められた骨髄、脾臓および肝臓についても摘出し、異常の有無を肉眼的に確認した後、卵巣はブアン液で固定し（長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液）、その他の器官・組織は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定して保存した。異常が観察された組織は常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織標本を作製し検査した。その他の組織は対照群および高用量群の全例について病理組織標本を作製して検査した。胃については、高用量群において異常が観察されたため、中および低用量群についても追加観察した。

2) 出生児

A. 産児数の算定

母動物の分娩完了を確認した日を生後 0 日とし、直ちに、雌雄別に産児数（生存児＋死亡児）を調べ、生存児について外表奇形の有無を観察した。

B. 一般状態および死亡児数の算定

毎日、死亡児数を数え、死亡児は直ちに剖検した。生存児については、生後1日から行動および身体的異常の有無を含む一般状態を毎日観察した。

C. 同腹生児数の調整

生後4日に同腹生児数を8匹（原則として雌雄各4匹）に調整した。同腹生児数が8匹に満たない場合は調整しなかった。

D. 体重測定

生後0、4、7、14 および 21 日に個体別に測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出した。

E. 性比および生存率の算定

母動物の剖検時に数えられた着床痕数ならびに分娩観察において数えられた産児数および生存児数（出産生児数）に基づき、分娩率 $[(\text{産児数} / \text{着床痕数}) \times 100]$ 、生児出産率 $[(\text{出産生児数} / \text{着床痕数}) \times 100]$ および出生率 $[(\text{出産生児数} / \text{産児数}) \times 100]$ を算定した。また、生後0日における性比 $[(\text{雄の生児数} / \text{生児数}) \times 100]$ を求めた。生後4日の同腹出生児数の調整に際しては、調整前の生児数を基に、新生児の4日の生存率 $[(\text{生後4日同腹生児数調整前の生児数} / \text{生後0日の生児数}) \times 100]$ を算出し、生後4日における性比 $[(\text{雄の生児数} / \text{生児数}) \times 100]$ を求めた。さらに、同腹出生児数の調整後の生児数および生後21日における生児数を基に、離乳率 $[(\text{生後21日の生児数} / \text{生後4日同腹生児数調整後の生児数}) \times 100]$ を算定した。

F. 剖検

死亡児は、外表異常の有無を観察して剖検し、10%ホルマリン液に固定して保存した。生後0日の死亡児については肺を摘出して生理食塩液に浮遊させ、浮遊しなかった例を死産と判定した。大きな損傷あるいは浸軟化が認められた死亡児については、固定および保存のみを行った。

同腹生児数の調整により生じた余剰児は、エーテルを吸入させて致死させた後、剖検し、10%ホルマリン液に固定して保存した。

生存児は、全例を生後21日にエーテル吸入により致死させて剖検した。その際、異常

が認められた器官は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定して保存した。また、全例のカーカスをアルコールで固定して、試験終了時まで保存し、異常の観察されたカーカスについてのみ、アルコールに浸漬して長期保存した。

7. 統計解析

性周期の型別頻度、交尾率、受胎率、出生児の形態異常出現頻度については Fisher の直接確率検定⁴⁾を行った。病理組織学検査所見では、グレード分けしたデータは、Mann-Whitney のU検定⁷⁾により、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率片側検定⁸⁾により対照群と HNA 各投与群との間の有意差検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値、あるいは litter ごとの平均値を 1 標本として、先ず Bartlett 法⁹⁾により各群の分散の一様性について検定を行った。分散が一様である場合には、一元配置型の分散分析⁸⁾を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett 法¹⁰⁾により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が 0 となる場合および分散が一様でない場合には、Kruskal-Wallis¹¹⁾の順位検定を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett 型¹⁰⁾の検定法により多重比較を行った。

【 結 果 】

I. 親動物

1. 一般状態

1) 雄 (Table 1; Appendices 1-1~1-4)

200 mg/kg 投与群を除く各群に 1 例ずつ死亡あるいは瀕死動物が認められた。各動物の死亡あるいは瀕死屠殺までの経過を以下に示す。

動物番号：MX01002 (投与 61 日瀕死剖検)

投与 59 日に、鼻周囲の被毛汚染および立毛が観察され、翌日には排便が減少し消瘦も認められた。さらにこれらが回復せず、投与 61 日には自発運動低下も認められたため、瀕死状態と判断して剖検した。

動物番号：MX02018 (投与 57 日瀕死剖検)

投与 52 日に軟便および歩行異常が観察され、翌日には、軟便はなかったが、眼および鼻周囲被毛の赤褐色汚染が観察され、自発運動低下が観察された。その翌日には消瘦が認められた。これらの症状は回復せず、投与 56 日には排便の減少が認められ、翌日には体表温も低下したため瀕死状態と判断して剖検した。

動物番号：MX03007 (投与 50 日死亡)

投与 46 日に、後躯マヒが観察され、これが回復せず、投与 49 日に左側眼瞼周囲被毛の赤褐色汚染が観察され、翌日死亡しているのが発見された。

生存例では、流涎が 200 mg/kg 投与群のほぼ全例に、また、鼻汁が少数例に、それぞれ投与後一過性に観察された。その他の変化としては、対照群の 1 例に、眼瞼および鼻周囲被毛の赤褐色汚染が投与 54 および 55 日に観察され、投与 54 から 58 日には右前肢の腫脹が、また、それに伴う跛行が投与 54 から 56 日に観察されたが回復した。これらの他に、脱毛あるいは痂皮の形成が 12.5 mg/kg 投与群を除く各群に散見された。

2) 雌 (Table 2; Appendices 2-1~2-4)

いずれの投与群の動物にも死亡および瀕死屠殺例はなかった。

投与に関連した所見としては、200 mg/kg 投与群の少数例に流涎が、また、1例に耳介および四肢の発赤が投与後一過性に認められた。その他の所見としては、脱毛あるいは痂皮形成が 50 mg/kg 以下の投与群に散見された。

2. 体重

1) 雄 (Figure 1; Tables 3~5; Appendices 3-1~5-4)

12.5 mg/kg 投与群の体重増加には、対照群との間に有意差は認められなかった。

50 mg/kg 投与群では、投与 43~50 日の増加量が対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な低値を示したが、一過性の変化であった。

200 mg/kg 投与群では、体重増加抑制が投与末期に認められ、投与 64~71、85~92 および 92~99 日の増加量が、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) な低値を示した。体重および累積増加量については、いずれの投与群も対照群との間に有意差は認められなかったが、解剖日である投与 99 日までの累積増加量は、HNA の用量に依存して低下する傾向が認められた。

2) 雌 (Figure 2; Tables 6~8; Appendices 6-1~8-4)

50 mg/kg 以下の投与群の体重増加には、いずれの時期も対照群との間に有意差は認められなかった。

200 mg/kg 投与群では、投与初期に体重増加の抑制が認められ、投与 1~8 日の増加量が対照群と比較して有意 ($p<0.01$) な低値を示した。そのため、投与 1~15 日の累積増加量も対照群と比較して有意 ($p<0.01$) に低い値を示したが、体重に有意差は認められなかった。妊娠期には、妊娠末期の体重増加が抑制を受け、妊娠 20 日の体重、妊娠 14~20 日の増加量および妊娠 20 日までの妊娠期間中の累積増加量が、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) な低値を示した。分娩後も体重増加抑制が認められ、哺育 0~4 日の増加量ならびに哺育 7 および 14 日までの哺育期間中の累積増加量が対照群と比較し

て有意 ($p<0.01$) な低値を示したが、体重については対照群との間に有意差は認められなかった。

3. 摂餌量

1) 雄 (Figure 3; Table 9; Appendices 9-1~9-4)

対照群と HNA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

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

いずれの時期も、対照群と HNA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

4. 性周期 (Table 11; Appendices 11-1~11-4)

投与開始前の2週間に亘る性周期観察では、12.5 mg/kg および 50 mg/kg 投与群の各1例が不正な周期を示した他には、いずれの投与群の動物も、正常周期に分類される4日あるいは5日周期、およびこれらが混在した4および5日周期を示した。12.5 mg/kg 投与群では、対照群と比較して、4日周期を示す動物がやや多かった ($p<0.05$) ため、平均発情回帰日数が短縮 ($p<0.01$) した。

投与開始後に性周期の変化した動物が対照群を含む各群に認められた。これらのうち、不正な周期に変化したのは、対照群および 50 mg/kg 投与群の各1例のみで、対照群と比較して投与開始後に性周期が変化した動物の頻度が HNA 各投与群で増加することはなかった。また、平均発情回帰日数にも対照群と HNA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

5. 交配成績 (Table 12; Appendices 12-1~12-4)

全例が交尾し、受胎した。また、同居開始から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数にも対照群と HNA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

6. 分娩および哺育所見 (Tables 2, 18; Appendices 2-1~2-4, 18-1~18-4)

生存産児の形態観察（後述）から、対照群の1例（母動物番号：FB01024）は、分娩時に産児に対して外傷を与えたものと判断されたが、分娩および哺育状態の異常はいずれの投与群の動物にも認められなかった。出産率および妊娠期間にも対照群と HNA 各投与群の間で有意差は認められなかった。

7. 解剖時検査所見

1) 雄

(1) 血液学検査所見 (Table 13; Appendices 13-1~13-4)

50 mg/kg 以上の投与群において赤血球数が対照群と比較して有意 ($p<0.01$) に増加した。白血球数を対照群と HNA 各投与群との間で比較すると、12.5 mg/kg および 50 mg/kg 投与群では有意 ($p<0.01$) に低下し、200 mg/kg 投与群では有意 ($p<0.05$) に増加した。白血球百分比については、50 mg/kg 投与群において分葉核白血球の比率が有意 ($p<0.01$) に増加し、リンパ球の比率が有意 ($p<0.01$) に低下した。その他の項目については対照群と HNA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

(2) 剖検所見 (Table 14; Appendices 14-1~14-4)

死亡および瀕死屠殺例

対照群における瀕死屠殺例（動物番号：MX01002）では、不整咬合および歯の破折が観察され、これに起因すると考えられる口蓋の損傷も観察されたが、その他の器官に異常は認められなかった。

12.5 mg/kg 投与群における瀕死屠殺例（動物番号：MX02018）および 50 mg/kg における死亡例（動物番号：MX03007）では、脾臓が重度に腫大し、胸腹部各リンパ節にも腫大が認められ、脳では、硬膜に暗色や暗赤色の領域が観察された。さらに、死亡例では脾臓の淡色化、出血、腹膜との癒着および腹腔内への出血、脳硬膜と軟膜との癒着、心臓における心嚢の肥厚および白濁、その一部の心外膜および肺胸膜との癒着が認められ、瀕死屠殺例では、脳の淡色化が認められた。これらの他に、胸腺の暗色化あるいは小型化、被毛の一部の汚れが認められ、死亡例の腺胃粘膜には褐色点が観察された。

定期解剖例

200 mg/kg 投与群のみに観察された所見としては、前胃粘膜の肥厚領域が6例に観察され、2例は白濁あるいは白色化を伴っていた。また、肝臓の腫大が3例に観察された。HNAの用量とは関連なく観察された所見としては、対照群に肝臓の横隔膜結節が認められ、12.5 mg/kg 投与群では、腎臓の一侧性または両側性の腎盂拡張が、また、50 mg/kg 投与群では副腎の暗色化あるいは淡色域がそれぞれ認められた。生殖器官では、50 mg/kg 投与群の1例に精巣および精巣上体の片側性の小型化が観察された他に異常は観察されなかった。

(3) 病理組織学所見 (Table 15; Appendices 15-1~15-4)

死亡および瀕死屠殺例

対照群の瀕死屠殺例については、不整咬合といった物理的原因により瀕死状態に陥ったため、歯および口蓋の組織学的観察は行わなかった。

12.5 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例1例および50 mg/kg の死亡例1例については、生存時に歩行の異常が認められ、剖検では脾臓の著しい腫大も観察されたことから、病変の観察された、脳、脾臓、心臓、リンパ節、骨髓および肝臓の他に、歩行の異常との関連性が疑われる器官についても病理組織学検査も実施した。その結果、骨髓には、比較的狭い弱好酸性の細胞質をもち、類円形の核を有する淡明な細胞が充満しており、分裂像も多数みられ、骨周囲組織あるいは周囲血管内に浸潤している像も認められた。この細胞に環状および分葉状の核は認められなかったが、通常の顆粒球よりは大きく、骨髓芽球に近いと考えられる形態であった。骨髓で観察された細胞は、脾臓では赤脾髄を中心に顕著に増殖し、リンパ節では髓洞に充満していた他、肝臓ではグリソン鞘を中心に類洞内に彌慢性に浸潤していた。また、脳硬膜、坐骨神経の周膜、心嚢および周囲の癒着部にも同様の細胞の浸潤が観察された。これらの所見から、骨髓で観察された細胞は白血病細胞であると断定し、この2例を骨髓性白血病と診断した。これらの例の下垂体、胃、副腎、精巣、精巣上体、凝固腺、精囊、前立腺腹葉の各組織に異常は認められなかった。

定期解剖例

各器官および組織に認められた所見を以下に示す。

(下垂体)

対照群および 200 mg/kg 投与群に、ラトケ囊の拡張が観察されたが、頻度および程度に両群間で有意差は認められなかった。

(精巣および精巣上体)

剖検時に小型化の観察された 50 mg/kg 投与群の 1 例の片側に、間質の水腫を伴う精細管およびライディッヒ細胞の萎縮がみられ、同側の精巣上体の管腔に精子はほとんど認められず、ごく少数の細胞残屑のみが観察された。対照群および 200 mg/kg 投与群の動物に異常は観察されなかった。

(精囊)

対照群および 200 mg/kg 投与群の動物に異常は観察されなかった。

(前立腺腹葉)

対照群および 200 mg/kg 投与群の間質にリンパ球浸潤が観察されたが、対照群と比較して 200 mg/kg 投与群における頻度は有意 ($p < 0.01$) に低下していた。リンパ球浸潤の程度が強かった対照群の例では、上皮および管腔への好中球浸潤も観察された。

(凝固腺)

対照群および 200 mg/kg 投与群の動物に異常は観察されなかった。

(胃)

50 mg/kg 以上の投与群の前胃粘膜に扁平上皮の過形成が認められ、その程度は 50 mg/kg 以上の投与群において、また、頻度は 200 mg/kg 投与群において対照群と比較して有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) に増強された (Photos 1、2)。

(副腎)

対照群の 1 例に、被膜の限局性線維化が観察されたが、200 mg/kg 投与群に異常は認められなかった。

(肝臓)

門脈周囲性の肝細胞の脂肪化は、200 mg/kg 投与群を除く各群に認められたため、200 mg/kg 投与群における頻度が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) な低値を示した。また、対照群では肝海綿状変性が観察された。しかし、白血病に関連した所見は、いずれの動物に

も認められなかった。

(脾臓)

全例に髄外造血および褐色色素の沈着が観察されたが、これらの程度に対照群と HNA 各投与群との間で有意差は認められず、白血病に関連した所見は、いずれの動物にも認められなかった。

(骨髓)

いずれの動物にも異常は観察されなかった。

(剖検時異常器官)

腎盂の拡張が観察された 12.5 mg/kg 投与群の 2 例には、皮質の好塩基性尿細管を伴う腎盂の拡張が観察され、そのうちの 1 例に鉍質沈着および eosinophilic body が、他の 1 例には皮髄境界部に嚢胞が観察された。

2) 雌

(1) 剖検所見 (Table 16; Appendices 16-1~16-4)

対照群および 12.5 mg/kg 投与群に異常は観察されなかった。50 mg/kg 投与群では、両側性の腎盂の拡張が 1 例に観察された。同様の变化は、200 mg/kg 投与群の 1 例にも観察された。この他、200 mg/kg 投与群では、前胃粘膜の肥厚領域、片側子宮角の腫大および卵管の結節がそれぞれ 1 例ずつ観察された。

(2) 病理組織学所見 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

各器官および組織に認められた所見を以下に示す。

(下垂体)

対照群および 200 mg/kg 投与群の動物に異常は観察されなかった。

(卵巢)

対照群および 200 mg/kg 投与群の動物に異常は観察されなかった。

(子宮角および頸部)

対照群および 200 mg/kg 投与群の動物に異常は観察されなかった。

(腔)

200 mg/kg 投与群の 1 例の粘膜固有層に嚢胞が観察されたがその頻度および程度には対照群との間に有意差は認められなかった。

(胃)

200 mg/kg 投与群の前胃粘膜に扁平上皮の過形成が認められ、その程度および頻度ともに対照群と比較して有意 ($p<0.01$) に増強されていた。

(副腎)

対照群および 200 mg/kg 投与群の動物に異常は観察されなかった。

(剖検時異常器官)

腎盂の拡張が観察された 50 mg/kg および 200 mg/kg 投与群の各 1 例の腎臓には、皮質の好塩基性尿細管を伴う腎盂の拡張が観察され、そのうちの 200 mg/kg 投与群の例は程度も強く、移行上皮の過形成も観察された。

結節の観察された 200 mg/kg 投与群の 1 例の卵管には、粘膜および粘膜固有層に好中球の浸潤を伴う管腔の嚢胞状拡張が認められた。

(3) 着床数 (Table 18; Appendices 18-1~18-4)

着床数に対照群と HNA 各投与群の間に有意差は認められなかった。

II. 出生児

1. 一般状態および生存性 (Table 18; Appendices 18-1~18-4)

いずれの投与群の動物も行動を含む一般状態に異常は認められなかった。

生存性については、出生日に発見された死亡児のうち、死産児の頻度は、対照群では 5 例中 4 例であったのに対し、12.5 mg/kg および 200 mg/kg 投与群では 3 例全例が死産児であった。また、50 mg/kg 投与群では観察した 1 例は出生後死亡であったが、対照群と HNA 各投与群との間に有意差は認められなかった。産児数、分娩率、出生日ならびに生後 4 および 21 日における生存児数、生児出産率、出生率、新生児の 4 日の生存率および離乳率についても対照群と HNA 各投与群との間に有意差は認められず、各時期の性比にも有意差は認められなかった。

2. 体重 (Table 19; Appendices 19-1~19-4)

50 mg/kg 以下の投与群では、いずれの時期も雌雄出生児の体重には対照群との間に有意差は認められなかった。200 mg/kg 投与群については、出生日から生後 21 日に至るまで、雌雄ともに対照群と比較して有意 ($p<0.01$) な低値を示した。

3. 形態観察所見 (Table 20)

生存産児の形態観察 (表には示さず) では、対照群の 1 腹 (母動物番号: FB01024) の 1 例に外傷による吻部欠損が認められた。また、200 mg/kg 投与群の 1 腹 (母動物番号: FB04015) の 1 例に曲尾が観察された。

死亡児、同腹生児数調整における余剰児、ならびに生後 21 日の剖検では、対照群の動物には変異および奇形を含む形態変化は観察されなかった。HNA 投与群では、12.5 mg/kg および 50 mg/kg 投与群のそれぞれ 25 腹中 1 腹、ならびに 200 mg/kg 投与群の 25 腹中 3 腹の出生児に形態変化が認められた。これらのうち、外表奇形は、12.5 mg/kg 投与群では 1 腹 (母動物番号: FB02003) の 1 例 (生後 21 日剖検児) に短尾が認められた。また、200 mg/kg 投与群では、2 腹のうち 1 腹の出生児 (母動物番号: FB04015) には、短尾 (生後 4 日余剰児 4 例および生後 21 日剖検児 1 例)、短曲尾 (生後 4 日余剰児 1 例) あるいは曲尾 (生後 21 日剖検児 1 例) が、また、他の 1 腹の死亡児 (母動物番号: FB04021) には小眼が 1 例認められた。内臓奇形は、200 mg/kg 投与群の 2 腹 (母動物番号: FB04012 および FB04021) の死亡児に、横隔膜ヘルニアあるいは脾臓の低形成および精巣の位置異常がそれぞれ 1 例ずつ観察された。これらの他に、内臓変異のひとつである腎盂の拡張が、50 mg/kg 投与群に観察された。剖検した出生児について形態変化を認めた出生児の総数を求め、その割合を対照群と HNA 各投与群との間で比較すると、外表に関しては、200 mg/kg 投与群において有意 ($p<0.01$) に増加したが、内臓に関しては有意差は認められなかった。

【 考 察 】

1. 親動物

雄では、200 mg/kg 投与群を除く各群で死亡あるいは瀕死動物が1例ずつ認められた。これらのうち、対照群の動物は、不整咬合に起因した摂食不良によって全身状態が悪化したものと考えられる。12.5 および 50 mg/kg 投与群の動物は、病理組織学検査から、いずれも骨髓性白血病と診断された。最終剖検時に、全例について血液検査を行い、また、骨髓、肝臓および脾臓の病理組織学検査を実施した。しかし、これらの検査では骨髓性白血病に関連した変化は認められなかったことから、低および中用量群の各1例に発症した骨髓性白血病に HNA 投与は関与しないものと考えられた。

一般状態の変化としては、雌雄ともに 200 mg/kg 投与群において、流涎および鼻汁が投与後一過性に観察された。これらは、高用量群のみに認められた変化であり、投与に付随して観察された変化であることから、HNA 投与に起因した変化であると考えられる。その他の変化については、1例のみの発生あるいは HNA の用量とは無関係に観察されたものであることから、偶発的变化であると考えられる。

摂餌量には HNA 投与の影響は認められなかったが、体重については、雌雄ともに 200 mg/kg 投与群において増加抑制が認められた。高用量群に認められた変化であることから、HNA 投与に起因した変化であると考えられる。体重増加抑制は、雄では投与末期に、雌では投与初期、妊娠末期および哺育初期～中期に認められた。

生殖能力に関しては、12.5 mg/kg 投与群において投与開始前の時期の性周期観察における平均発情回帰日数が対照群と比較して有意 ($p<0.01$) に短縮したが、投与開始後に性周期が変化した動物の頻度が増加することなく、平均発情回帰日数にも変化は認められなかったことから、HNA 投与は性周期に影響を及ぼさないものと考えられた。また、全例が交尾し、受胎し、分娩異常および哺育状態の異常も観察されなかった。さらに、出産率、妊娠期間および着床数にも HNA 投与の影響は認められなかった。しかし、後述のように、200 mg/kg 投与群では出生児体重が抑制され、HNA 投与が母動物の泌乳量を抑制した可能性は否定できない。

剖検では、雌雄の生殖器官に HNA の用量に依存した変化は認められなかった。しかし、予備試験において認められた胃辺縁部の粘膜肥厚と同一の所見である、前胃粘膜の肥厚領域が200 mg/kg 投与群の雄動物に観察された。さらに、病理組織学検査では、50 mg/kg 以上の投与群の雄、および200 mg/kg 投与群の雌に、前胃粘膜扁平上皮の過形成が観察された。HNA には、皮膚および粘膜に対する刺激性のあることが示唆されており¹⁾、前胃粘膜の組織変化はこうした HNA の粘膜刺激性に起因した変化であると推測される。200 mg/kg 投与群の雄には、肝臓の腫大も観察された。病理組織学検査では、門脈周囲の脂肪化の程度に減弱が認められたが、腫大に関連した明瞭な組織変化は観察されなかったことから、肝臓の腫大については、HNA 投与との間に明瞭な関連性はないものと考えられた。この他、骨髓性白血病の診断のために実施した雄の血液検査において、50 mg/kg 以上の投与群の赤血球数が増加した。HNA を4週間反復投与した試験⁵⁾ではこうした変化は報告されていない。しかし、HNA の用量に依存して赤血球数が増加していることから、50 mg/kg 以上の HNA は雄の赤血球数を増加させるものと考えられる。一方、HNA の4週間反復投与試験で認められている副腎の壊死⁵⁾は、本試験では雌雄ともに観察されなかった。

2. 出生児

行動を含む一般状態および生存性には HNA 投与の影響は認められなかった。しかし、体重は、200 mg/kg 投与群において出生日から21日に至るまで低値で推移し、200 mg/kg の HNA は出生児体重を抑制するものと考えられる。出生児の体重増加抑制には、乳汁移行した HNA あるいはその代謝産物が出生児に対して直接影響を及ぼした可能性も考えられる。しかし、200 mg/kg 投与群では、泌乳量が増加する時期である哺育初期～中期に母体重が増加抑制を受けていることから、母動物に泌乳量の低下があった可能性も否定できない。

200 mg/kg 投与群において奇形および変異などの形態変化を認めた出生児の頻度がやや増加した。最も高頻度に認められたのは尾の外表奇形であったが、1腹の出生児のみに認められた変化であった。その他の奇形はいずれも1例のみの発生であったことから、偶発的変化である可能性が高い。しかし、剖検した総出生児に占める外表異常児の頻度が200 mg/kg 投与群で有意に増加したことから、HNA の催奇形性について否定はできなかった。

3. 無作用量

以上の試験成績から、本試験条件下では、HNA の無作用量は、生殖に関しては、雄では 200 mg/kg/day と推定される。雌および出生児では、出生児体重に抑制が認められたことから 50 mg/kg/day であり、生殖以外の一般項目については、体重増加抑制および前胃粘膜扁平上皮の過形成が観察されたことから、雄では 12.5 mg/kg/day であり、雌では 50 mg/kg/day であると推定される。

【 文 献 】

- 1) Arnold, *et al.*: The biological availability of riboflavin solubilized with sodium 3-hydroxy-2-naphthoate. Poultry Sci. 31 : 350 (1952).
- 2) National Technical Information Service: OTS0533574.
- 3) Marhold, J.: Prehled Prumyslove Toxikologie; Organicke Latky, p.663, (1986).
- 4) National Technical Information Service: OTS0535574.
- 5) EPA/OTS; Doc #88-950000008: Subacute 28-day oral toxicity study with beta-hydroxynaphthoic acid in rats with over letter dated 100694.
- 6) 吉村 功 : 毒性・薬効データの統計解析 (吉村 功編)、サイエンティスト社、東京 (1977).
- 7) 丹後俊郎 : 医学への統計学 (古川俊之 監修)、朝倉書店、東京 (1985).
- 8) 石居 進 : 生物統計学入門、培風館、東京 (1992).
- 9) 佐久間昭 : 薬効評価－計画と解析、東京大学出版会、東京 (1977).
- 10) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491 (1964).
- 11) Kruskal, W. H., Wallis, W. A.: Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Assoc., 47: 583-621 (1952).
- 12) 被験物質提供元資料

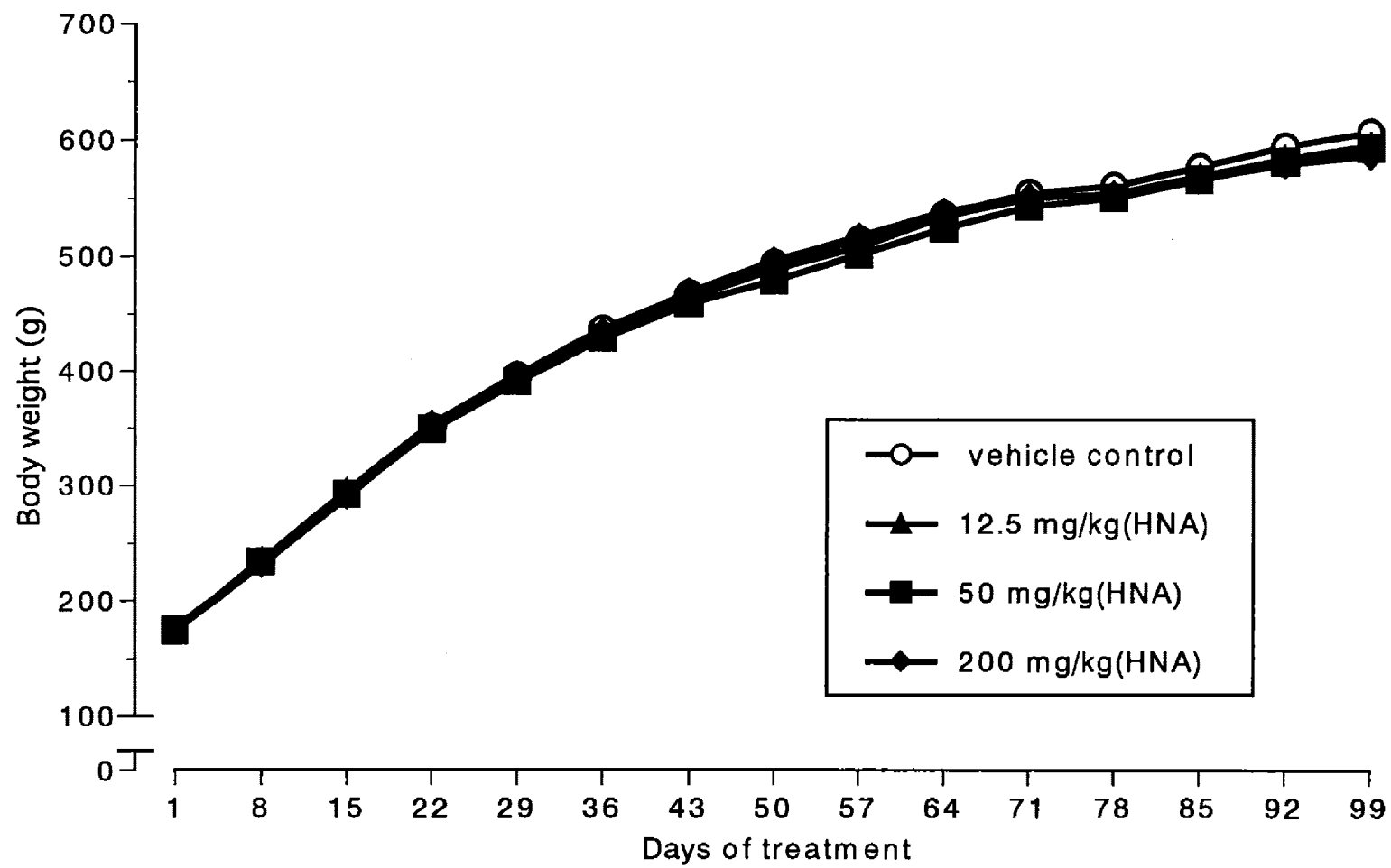


Figure 1 Body weight of males

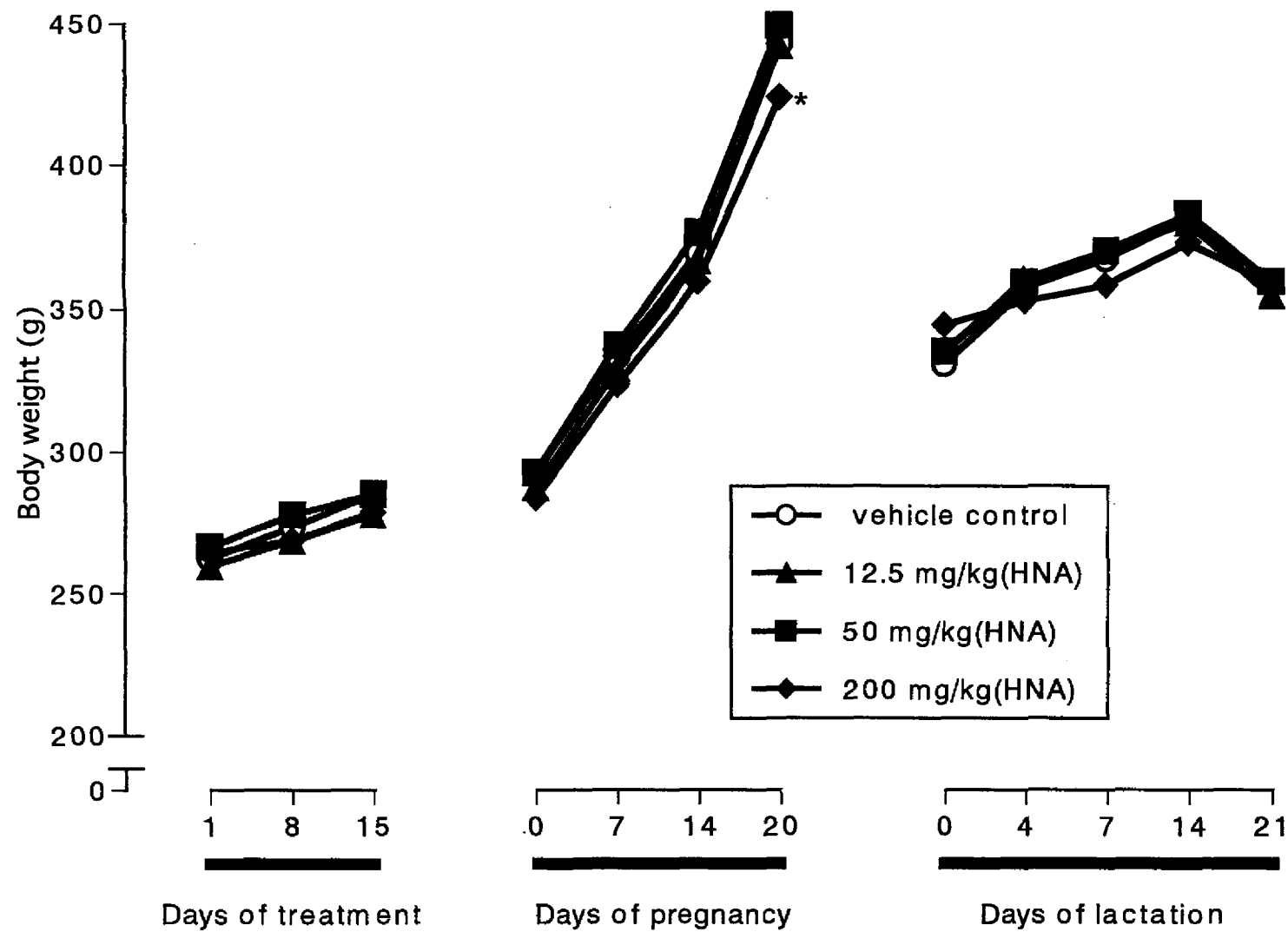


Figure 2 Body weight of females

* :significant difference from control, $p < 0.05$

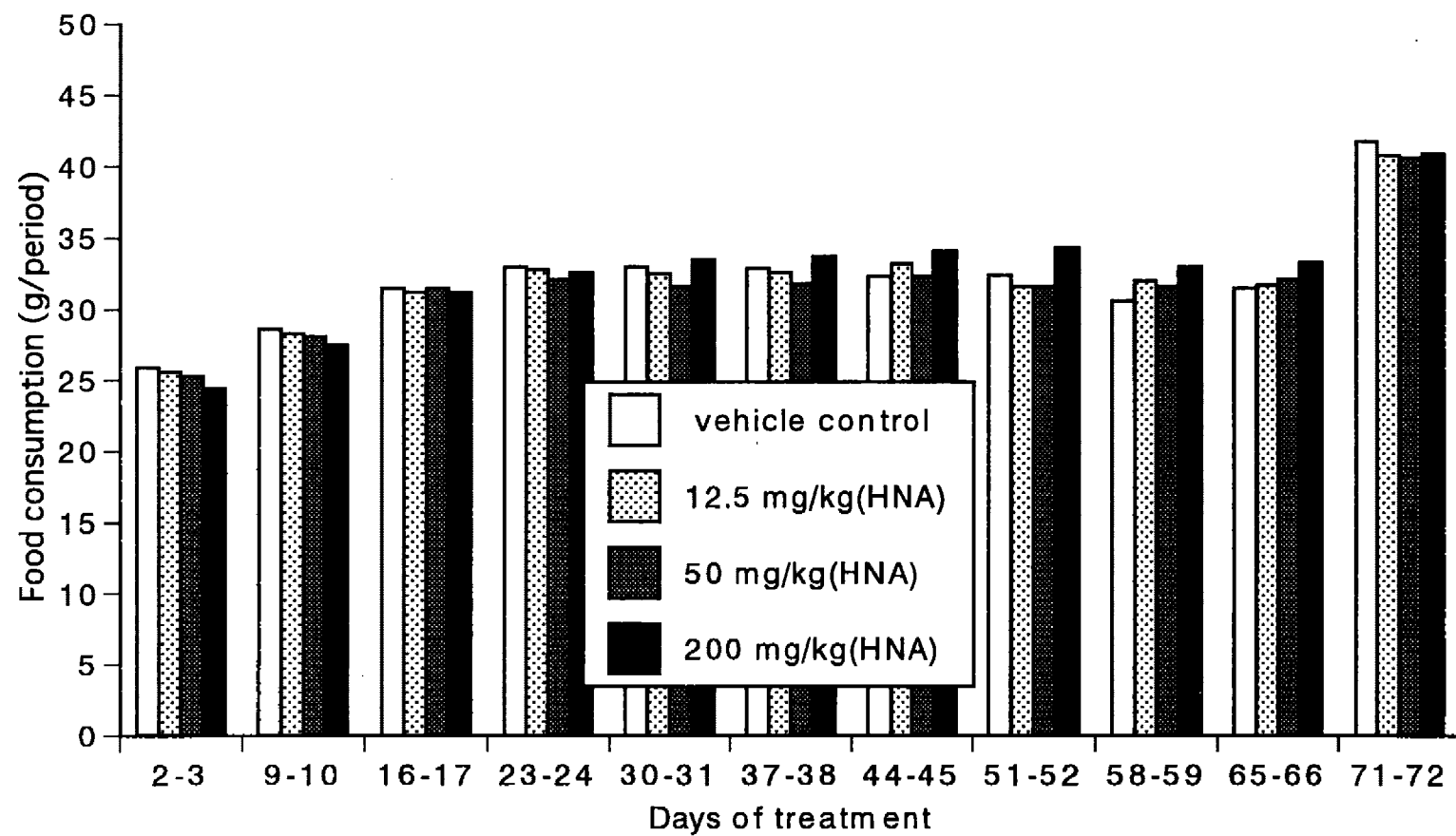


Figure 3 Food consumption of males

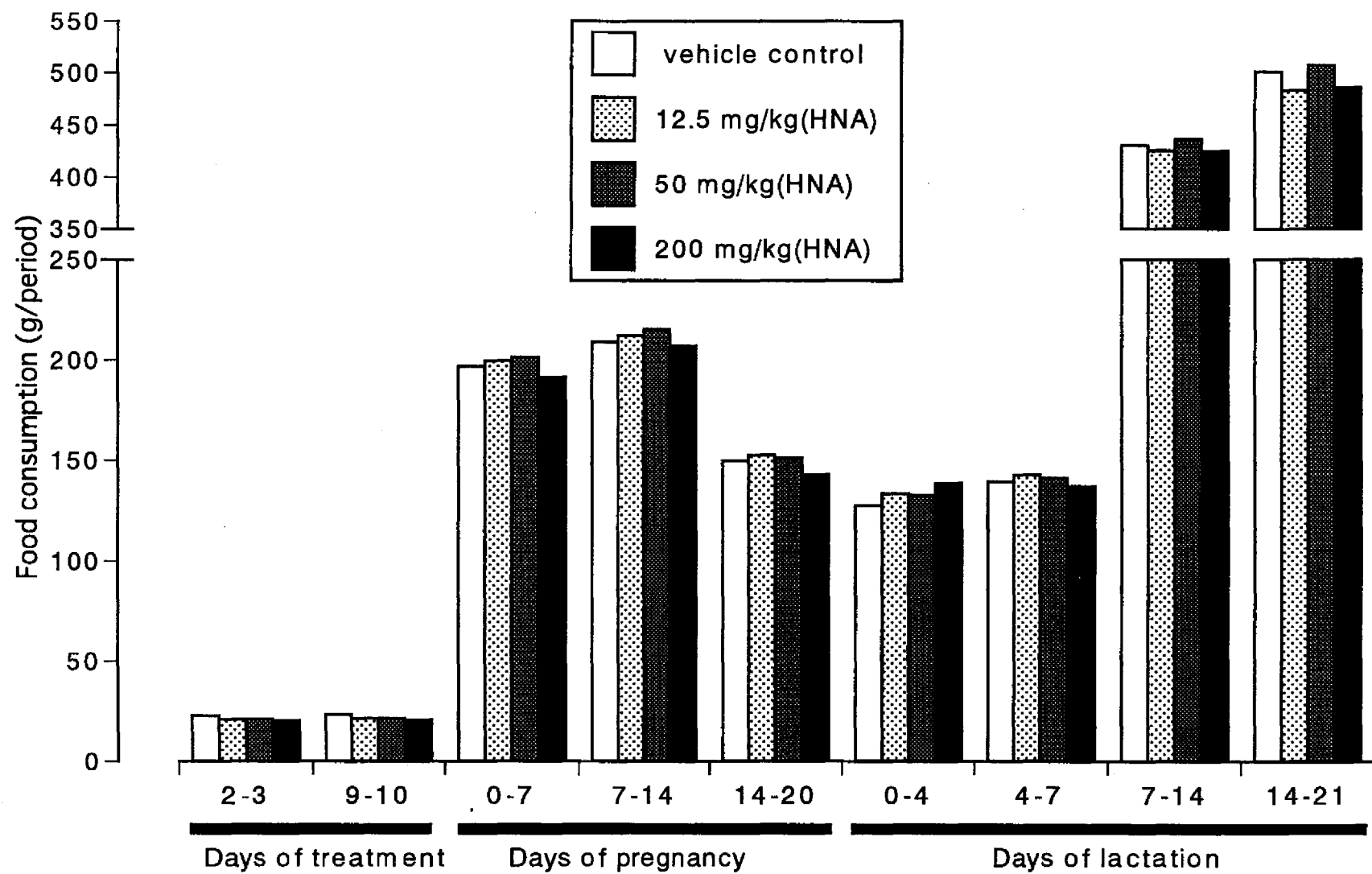


Figure 4 Food consumption of females

【TABLE INDEX】

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

TABLE No.	APPENDIX No.	TABLE TITLE
1	1-1 ~ 1-4	Summary of clinical signs of F ₀ males
2	2-1 ~ 2-4	Summary of clinical signs and maternal condition of F ₀ females
3	3-1 ~ 3-4	Body weight of F ₀ males
4	4-1 ~ 4-4	Body weight gain of F ₀ males
5	5-1 ~ 5-4	Cumulative body weight gain of F ₀ males
6	6-1 ~ 6-4	Body weight of F ₀ females
7	7-1 ~ 7-4	Body weight gain of F ₀ females
8	8-1 ~ 8-4	Cumulative body weight gain of F ₀ females
9	9-1 ~ 9-4	Food consumption of F ₀ males
10	10-1 ~ 10-4	Food consumption of F ₀ females
11	11-1 ~ 11-4	Estrous cycle
12	12-1 ~ 12-4	Reproductive performance
13	13-1 ~ 13-4	Hematological findings of F ₀ males after oral administration for 98 days
14	14-1 ~ 14-4	Summary of macroscopic findings in F ₀ males at the end of the dosing period
14-S/D		Summary of macroscopic findings in F ₀ males sacrificed in a moribund condition or died
15	15-1 ~ 15-4	Summary of histopathological findings in F ₀ males at the end of the dosing period
15-S/D		Summary of histopathological findings in F ₀ males sacrificed in a moribund condition or died
16	16-1 ~ 16-4	Summary of macroscopic findings in F ₀ females
17	17-1 ~ 17-4	Summary of histopathological findings in F ₀ females
18	18-1 ~ 18-4	Development of F ₁ pups up to day 21 after birth
19	19-1 ~ 19-4	Body weight of F ₁ pups up to day 21 after birth
20		Morphological findings of F ₁ offspring

Table 1

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of clinical signs of F₀ males

Compound Dose group (mg/kg)	H N A			
	0 ^{a)}	12.5	50	200
No. of males examined	25	25	25	25
No. of males with abnormality	3	1	3	23
<u>Category of abnormality; N</u>				
Death or moribundity	1	1	1	0
Transient salivation after dosing	0	0	0	22
Transient nasal discharge after dosing	0	0	0	2
Soiled fur around eyelid or nose	2	1	1	0
Loss of fur	1	0	1	4
Crust formation	1	0	1	2
Decrease in number of feces	1	1	0	0
Loose stool	0	1	0	0
Decrease in locomotor activity	1	1	0	0
Paralytic gait	0	0	1	0
Swelling and abnormal gait of right forelimb	1	0	0	0
Abnormal gait	0	1	0	0
Emaciation	1	1	0	0
Hypothermia	0	1	0	0
Piloerection	1	0	0	0

^{a)} : Vehicle control, 0.5% CMC Na (5 mL/kg)

Table 2

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of clinical signs and maternal condition of F₀ females

Compound Dose group (mg/kg)	H N A			
	0 ^{a)}	12.5	50	200
No. of females examined	25	25	25	25
No. of females with abnormality	3	4	1	3
<u>Category of abnormality; N</u>				
Transient salivation after dosing	0	0	0	2
Loss of fur	3	4	1	0
Crust formation	0	2	0	0
Transient flush of pinna and feet	0	0	0	1

^{a)} : Vehicle control, 0.5% CMC Na (5 mL/kg)

Table 3

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

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

Compound	HNA			
	a) 0	12.5	50	200
Days of treatment				
1	174.3 $\pm$ 10.1 (25)	174.4 $\pm$ 9.5 (25)	175.0 $\pm$ 9.4 (25)	174.1 $\pm$ 9.5 (25)
8	233.5 $\pm$ 17.0 (25)	235.1 $\pm$ 18.4 (25)	234.1 $\pm$ 15.2 (25)	231.6 $\pm$ 15.3 (25)
15	292.9 $\pm$ 23.0 (25)	295.5 $\pm$ 24.6 (25)	292.2 $\pm$ 21.8 (25)	290.8 $\pm$ 17.3 (25)
22	351.4 $\pm$ 28.0 (25)	353.8 $\pm$ 30.2 (25)	349.2 $\pm$ 26.0 (25)	350.6 $\pm$ 21.6 (25)
29	396.4 $\pm$ 32.9 (25)	397.1 $\pm$ 37.2 (25)	391.0 $\pm$ 31.4 (25)	396.4 $\pm$ 25.5 (25)
36	437.3 $\pm$ 35.9 (25)	433.7 $\pm$ 42.0 (25)	428.9 $\pm$ 36.6 (25)	434.5 $\pm$ 27.9 (25)
43	467.6 $\pm$ 38.9 (25)	464.1 $\pm$ 45.5 (25)	459.1 $\pm$ 39.9 (25)	469.0 $\pm$ 32.4 (25)
50	494.3 $\pm$ 41.8 (25)	489.0 $\pm$ 50.2 (25)	478.7 $\pm$ 40.7 (24)	496.3 $\pm$ 34.3 (25)
57	514.7 $\pm$ 46.1 (25)	508.0 $\pm$ 58.8 (25)	501.6 $\pm$ 39.7 (24)	516.8 $\pm$ 36.0 (25)
64	536.3 $\pm$ 48.5 (24)	534.8 $\pm$ 61.7 (24)	524.1 $\pm$ 43.0 (24)	538.6 $\pm$ 39.7 (25)
71	555.0 $\pm$ 48.9 (24)	550.4 $\pm$ 64.8 (24)	543.3 $\pm$ 45.1 (24)	551.1 $\pm$ 42.9 (25)
78	560.9 $\pm$ 50.3 (24)	553.5 $\pm$ 65.6 (24)	550.4 $\pm$ 43.9 (24)	553.3 $\pm$ 43.8 (25)
85	576.9 $\pm$ 51.1 (24)	568.7 $\pm$ 67.1 (24)	565.9 $\pm$ 44.5 (24)	567.3 $\pm$ 46.3 (25)
92	594.4 $\pm$ 52.4 (24)	584.1 $\pm$ 69.8 (24)	581.1 $\pm$ 47.7 (24)	578.7 $\pm$ 47.8 (25)
99	606.7 $\pm$ 55.1 (24)	595.4 $\pm$ 71.2 (24)	593.0 $\pm$ 47.4 (24)	586.2 $\pm$ 50.6 (25)

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

Table 4

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

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

Compound	HNA			
	a) 0	12.5	50	200
Days of treatment				
1~8	59.2 $\pm$ 8.0 (25)	60.7 $\pm$ 11.0 (25)	59.2 $\pm$ 7.3 (25)	57.4 $\pm$ 6.7 (25)
8~15	59.4 $\pm$ 7.5 (25)	60.4 $\pm$ 8.4 (25)	58.0 $\pm$ 8.3 (25)	59.2 $\pm$ 5.8 (25)
15~22	58.5 $\pm$ 9.0 (25)	58.3 $\pm$ 8.6 (25)	57.0 $\pm$ 7.5 (25)	59.8 $\pm$ 8.8 (25)
22~29	45.0 $\pm$ 9.5 (25)	43.4 $\pm$ 10.4 (25)	41.8 $\pm$ 8.6 (25)	45.9 $\pm$ 8.7 (25)
29~36	41.0 $\pm$ 7.5 (25)	36.6 $\pm$ 7.4 (25)	37.9 $\pm$ 7.0 (25)	38.1 $\pm$ 5.7 (25)
36~43	30.3 $\pm$ 7.7 (25)	30.4 $\pm$ 6.5 (25)	30.2 $\pm$ 5.4 (25)	34.4 $\pm$ 7.4 (25)
43~50	26.7 $\pm$ 5.7 (25)	24.9 $\pm$ 8.4 (25)	22.2 $\pm$ 5.6* (24)	27.4 $\pm$ 5.4 (25)
50~57	20.5 $\pm$ 8.2 (25)	19.1 $\pm$ 19.9 (25)	23.0 $\pm$ 5.8 (24)	20.5 $\pm$ 5.5 (25)
57~64	22.7 $\pm$ 5.4 (24)	22.9 $\pm$ 6.6 (24)	22.4 $\pm$ 6.0 (24)	21.8 $\pm$ 4.9 (25)
64~71	18.6 $\pm$ 7.0 (24)	15.7 $\pm$ 5.5 (24)	19.2 $\pm$ 4.4 (24)	12.6 $\pm$ 8.5* (25)
71~78	6.0 $\pm$ 8.5 (24)	3.0 $\pm$ 7.2 (24)	7.2 $\pm$ 6.7 (24)	2.2 $\pm$ 8.3 (25)
78~85	15.9 $\pm$ 6.0 (24)	15.2 $\pm$ 5.2 (24)	15.5 $\pm$ 5.2 (24)	14.0 $\pm$ 6.2 (25)
85~92	17.5 $\pm$ 2.8 (24)	15.4 $\pm$ 4.6 (24)	15.1 $\pm$ 7.4 (24)	11.4 $\pm$ 4.6** (25)
92~99	12.4 $\pm$ 5.3 (24)	11.4 $\pm$ 6.0 (24)	11.9 $\pm$ 5.4 (24)	7.5 $\pm$ 8.4* (25)

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

*: significant difference from control, $p < 0.05$ **: significant difference from control, $p < 0.01$

Table 5

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Cumulative body weight gain of F₀ males (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	HNA			
	a) 0	12.5	50	200
Days of treatment				
1~ 8	59.2 $\pm$ 8.0 (25)	60.7 $\pm$ 11.0 (25)	59.2 $\pm$ 7.3 (25)	57.4 $\pm$ 6.7 (25)
1~ 15	118.6 $\pm$ 14.7 (25)	121.1 $\pm$ 16.8 (25)	117.2 $\pm$ 14.4 (25)	116.7 $\pm$ 9.9 (25)
1~ 22	177.1 $\pm$ 20.0 (25)	179.3 $\pm$ 22.8 (25)	174.2 $\pm$ 18.6 (25)	176.4 $\pm$ 16.2 (25)
1~ 29	222.1 $\pm$ 25.3 (25)	222.7 $\pm$ 30.4 (25)	216.0 $\pm$ 24.4 (25)	222.3 $\pm$ 21.9 (25)
1~ 36	263.1 $\pm$ 29.0 (25)	259.3 $\pm$ 35.5 (25)	253.9 $\pm$ 30.0 (25)	260.4 $\pm$ 24.9 (25)
1~ 43	293.4 $\pm$ 32.6 (25)	289.7 $\pm$ 38.8 (25)	284.1 $\pm$ 33.4 (25)	294.8 $\pm$ 30.2 (25)
1~ 50	320.0 $\pm$ 35.7 (25)	314.5 $\pm$ 43.7 (25)	304.2 $\pm$ 35.0 (24)	322.2 $\pm$ 32.3 (25)
1~ 57	340.5 $\pm$ 40.3 (25)	333.6 $\pm$ 52.2 (25)	327.2 $\pm$ 34.3 (24)	342.7 $\pm$ 33.7 (25)
1~ 64	361.4 $\pm$ 42.0 (24)	360.0 $\pm$ 55.1 (24)	349.6 $\pm$ 38.0 (24)	364.4 $\pm$ 37.5 (25)
1~ 71	380.0 $\pm$ 43.1 (24)	375.7 $\pm$ 58.2 (24)	368.8 $\pm$ 40.4 (24)	377.0 $\pm$ 40.3 (25)
1~ 78	386.0 $\pm$ 44.9 (24)	378.7 $\pm$ 58.9 (24)	376.0 $\pm$ 39.4 (24)	379.2 $\pm$ 41.3 (25)
1~ 85	401.9 $\pm$ 45.8 (24)	393.9 $\pm$ 60.7 (24)	391.5 $\pm$ 40.1 (24)	393.2 $\pm$ 43.6 (25)
1~ 92	419.4 $\pm$ 47.1 (24)	409.3 $\pm$ 63.3 (24)	406.6 $\pm$ 43.3 (24)	404.6 $\pm$ 45.2 (25)
1~ 99	431.8 $\pm$ 49.9 (24)	420.7 $\pm$ 65.0 (24)	418.6 $\pm$ 43.2 (24)	412.1 $\pm$ 48.4 (25)

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

Table 6

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Body weight of F₀ females (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	HNA			
	a) 0	12.5	50	200
Days of treatment				
1	262.4 $\pm$ 15.4 (25)	259.6 $\pm$ 18.3 (25)	266.4 $\pm$ 14.6 (25)	264.4 $\pm$ 14.1 (25)
8	273.5 $\pm$ 18.3 (25)	268.6 $\pm$ 21.6 (25)	277.8 $\pm$ 16.5 (25)	268.7 $\pm$ 16.7 (25)
15	285.0 $\pm$ 20.2 (25)	277.7 $\pm$ 22.2 (25)	285.1 $\pm$ 17.0 (25)	278.7 $\pm$ 19.7 (25)
Days of pregnancy				
0	292.3 $\pm$ 22.3 (25)	287.1 $\pm$ 25.1 (25)	292.4 $\pm$ 18.0 (25)	283.5 $\pm$ 21.7 (25)
7	333.5 $\pm$ 20.9 (25)	328.9 $\pm$ 24.9 (25)	337.2 $\pm$ 20.4 (25)	323.3 $\pm$ 19.0 (25)
14	369.3 $\pm$ 19.7 (25)	366.7 $\pm$ 27.7 (25)	376.4 $\pm$ 22.9 (25)	359.4 $\pm$ 20.1 (25)
20	442.8 $\pm$ 23.1 (25)	441.8 $\pm$ 31.5 (25)	449.2 $\pm$ 29.6 (25)	423.8 $\pm$ 24.7* (25)
Days of lactation				
0	330.7 $\pm$ 24.0 (25)	335.1 $\pm$ 34.2 (25)	335.1 $\pm$ 29.3 (25)	344.3 $\pm$ 20.9 (25)
4	357.1 $\pm$ 21.0 (25)	360.2 $\pm$ 29.5 (25)	359.0 $\pm$ 22.4 (25)	352.5 $\pm$ 16.7 (25)
7	367.2 $\pm$ 20.8 (25)	369.9 $\pm$ 26.8 (25)	369.9 $\pm$ 23.0 (25)	358.0 $\pm$ 19.1 (25)
14	381.1 $\pm$ 17.7 (25)	379.7 $\pm$ 23.0 (25)	382.8 $\pm$ 22.0 (25)	372.8 $\pm$ 17.6 (25)
21	359.2 $\pm$ 17.6 (25)	354.5 $\pm$ 22.4 (25)	359.4 $\pm$ 18.5 (25)	358.2 $\pm$ 19.0 (25)

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

* : significant difference from control, $p < 0.05$

Table 7

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Body weight gain of F₀ females (g); Mean ± S.D. (N)

Compound	HNA			
	a) 0	12.5	50	200
Days of treatment				
1~ 8	11.2 ± 7.3 (25)	9.0 ± 8.0 (25)	11.3 ± 7.1 (25)	4.4 ± 7.5** (25)
8~ 15	11.5 ± 6.5 (25)	9.1 ± 6.2 (25)	7.3 ± 5.6 (25)	10.0 ± 5.2 (25)
Days of pregnancy				
0~ 7	41.2 ± 6.7 (25)	41.8 ± 9.9 (25)	44.7 ± 8.2 (25)	39.8 ± 7.7 (25)
7~ 14	35.8 ± 5.9 (25)	37.8 ± 8.1 (25)	39.3 ± 7.6 (25)	36.1 ± 6.2 (25)
14~ 20	73.5 ± 12.4 (25)	75.0 ± 18.8 (25)	72.7 ± 13.2 (25)	64.5 ± 9.4** (25)
Days of lactation				
0~ 4	26.5 ± 15.4 (25)	25.2 ± 14.4 (25)	23.9 ± 18.7 (25)	8.1 ± 11.4** (25)
4~ 7	10.0 ± 9.0 (25)	9.6 ± 9.4 (25)	10.9 ± 7.7 (25)	5.5 ± 8.0 (25)
7~ 14	13.9 ± 9.2 (25)	9.9 ± 10.5 (25)	12.8 ± 13.5 (25)	14.8 ± 10.4 (25)
14~ 21	-21.9 ± 10.7 (25)	-25.3 ± 12.6 (25)	-23.4 ± 11.4 (25)	-14.6 ± 10.6 (25)

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

**: significant difference from control, p<0.01

Table 8

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Cumulative body weight gain of F₀ females (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	HNA			
	a) 0	12.5	50	200
Days of treatment				
1~8	11.2 $\pm$ 7.3 (25)	9.0 $\pm$ 8.0 (25)	11.3 $\pm$ 7.1 (25)	4.4 $\pm$ 7.5** (25)
1~15	22.7 $\pm$ 9.6 (25)	18.0 $\pm$ 10.0 (25)	18.7 $\pm$ 8.3 (25)	14.4 $\pm$ 10.7** (25)
Days of pregnancy				
0~7	41.2 $\pm$ 6.7 (25)	41.8 $\pm$ 9.9 (25)	44.7 $\pm$ 8.2 (25)	39.8 $\pm$ 7.7 (25)
0~14	77.0 $\pm$ 8.3 (25)	79.6 $\pm$ 14.4 (25)	84.0 $\pm$ 13.2 (25)	75.9 $\pm$ 11.4 (25)
0~20	150.5 $\pm$ 12.3 (25)	154.6 $\pm$ 26.8 (25)	156.7 $\pm$ 22.2 (25)	140.3 $\pm$ 14.9* (25)
Days of lactation				
0~4	26.5 $\pm$ 15.4 (25)	25.2 $\pm$ 14.4 (25)	23.9 $\pm$ 18.7 (25)	8.1 $\pm$ 11.4** (25)
0~7	36.5 $\pm$ 20.7 (25)	34.8 $\pm$ 19.7 (25)	34.8 $\pm$ 22.2 (25)	13.7 $\pm$ 12.3** (25)
0~14	50.5 $\pm$ 17.9 (25)	44.7 $\pm$ 22.7 (25)	47.6 $\pm$ 21.3 (25)	28.5 $\pm$ 12.5** (25)
0~21	28.5 $\pm$ 21.2 (25)	19.4 $\pm$ 26.1 (25)	24.3 $\pm$ 25.7 (25)	13.9 $\pm$ 15.0 (25)

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

*: significant difference from control, $p < 0.05$ **: significant difference from control, $p < 0.01$

Table 9

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Food consumption of F₀ males (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	HNA			
Dose (mg/kg)	a) 0	12.5	50	200
Days of treatment				
2~3	25.9 $\pm$ 2.4 (25)	25.6 $\pm$ 2.3 (25)	25.3 $\pm$ 2.0 (25)	24.4 $\pm$ 2.1 (25)
9~10	28.6 $\pm$ 3.2 (25)	28.3 $\pm$ 3.1 (25)	28.1 $\pm$ 2.5 (25)	27.5 $\pm$ 2.6 (25)
16~17	31.5 $\pm$ 3.6 (25)	31.2 $\pm$ 4.1 (25)	31.5 $\pm$ 3.0 (25)	31.2 $\pm$ 4.5 (25)
23~24	33.0 $\pm$ 3.3 (25)	32.8 $\pm$ 4.0 (25)	32.1 $\pm$ 3.1 (25)	32.6 $\pm$ 4.4 (25)
30~31	33.0 $\pm$ 3.5 (25)	32.5 $\pm$ 3.8 (25)	31.6 $\pm$ 3.0 (25)	33.5 $\pm$ 3.9 (25)
37~38	32.9 $\pm$ 2.6 (25)	32.6 $\pm$ 3.5 (25)	31.8 $\pm$ 3.0 (25)	33.7 $\pm$ 2.4 (25)
44~45	32.3 $\pm$ 3.1 (25)	33.2 $\pm$ 4.6 (25)	32.3 $\pm$ 3.2 (25)	34.1 $\pm$ 3.1 (25)
51~52	32.4 $\pm$ 3.0 (25)	31.6 $\pm$ 4.2 (25)	31.6 $\pm$ 3.0 (24)	34.3 $\pm$ 2.9 (25)
58~59	30.6 $\pm$ 7.0 (25)	32.0 $\pm$ 4.8 (24)	31.6 $\pm$ 3.1 (24)	33.0 $\pm$ 3.0 (25)
65~66	31.5 $\pm$ 2.8 (24)	31.7 $\pm$ 4.4 (24)	32.1 $\pm$ 3.3 (24)	33.3 $\pm$ 3.0 (25)
71~72 b)	41.8 $\pm$ 4.3 (24)	40.8 $\pm$ 4.4 (24)	40.6 $\pm$ 5.2 (24)	40.9 $\pm$ 5.5 (25)

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

b): consumed with cohabiting female

Table 10

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Food consumption of F₀ females (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	HNA			
	a) 0	12.5	50	200
Days of treatment				
2~3	22.8 $\pm$ 3.2 (25)	21.1 $\pm$ 3.9 (25)	21.3 $\pm$ 3.2 (25)	20.5 $\pm$ 3.0 (25)
9~10	23.3 $\pm$ 3.5 (25)	21.5 $\pm$ 2.4 (25)	21.6 $\pm$ 3.1 (25)	20.7 $\pm$ 4.6 (25)
Days of pregnancy				
0~7	196.8 $\pm$ 15.8 (25)	199.6 $\pm$ 21.0 (25)	201.4 $\pm$ 16.3 (25)	191.8 $\pm$ 18.8 (25)
7~14	208.8 $\pm$ 14.7 (25)	212.0 $\pm$ 26.1 (25)	215.4 $\pm$ 19.3 (25)	207.2 $\pm$ 17.5 (25)
14~20	149.8 $\pm$ 13.1 (25)	152.7 $\pm$ 16.4 (25)	151.3 $\pm$ 14.1 (25)	143.2 $\pm$ 15.8 (25)
Days of lactation				
0~4	127.8 $\pm$ 19.1 (25)	133.5 $\pm$ 20.9 (25)	132.7 $\pm$ 24.7 (25)	138.8 $\pm$ 13.1 (25)
4~7	139.5 $\pm$ 14.8 (25)	142.8 $\pm$ 17.0 (25)	141.2 $\pm$ 17.9 (25)	137.3 $\pm$ 13.6 (25)
7~14	430.7 $\pm$ 42.9 (25)	425.6 $\pm$ 44.3 (25)	436.6 $\pm$ 34.7 (25)	424.9 $\pm$ 33.9 (25)
14~21	501.7 $\pm$ 55.2 (25)	483.8 $\pm$ 57.0 (25)	507.5 $\pm$ 43.5 (25)	486.0 $\pm$ 36.6 (25)

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

Table 11

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Estrous cycle

Compound	HNA			
	0 ^{a)}	12.5	50	200
Dose (mg/kg)				
Number of females examined	25	25	25	25
Mean length of estrous cycle in days				
Pre-treatment period; Mean $\pm$ S.D.	4.3 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.0 **	4.1 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.3
Treatment period; Mean $\pm$ S.D.	4.3 $\pm$ 1.2	4.0 $\pm$ 0.0	4.1 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.3
Number of animals showing each type of cycle during pre-treatment period				
4-day cycle	16	24 #	21	22
5-day cycle	5	0	2	3
4/5-day cycle	4	0	1	0
Irregular	0	1	1	0
Changes of estrous cycle after treatment				
Number of animals whose estrous cycle was not changed	17	24	19	19
Number of animals whose estrous cycle was changed	8	1	6	6
[Pre-treatment] [Treatment]				
4-day $\rightarrow$ 5-day	0	0	0	1
4-day $\rightarrow$ 4/5-day	0	0	2	3
5-day $\rightarrow$ 4-day	4	0	1	0
5-day $\rightarrow$ 4/5-day	0	0	0	2
5-day $\rightarrow$ irregular	1	0	1	0
4/5-day $\rightarrow$ 4-day	2	0	1	0
4/5-day $\rightarrow$ 5-day	1	0	0	0
irregular $\rightarrow$ 4-day	0	1	1	0
Number of vaginal estrus during mating period				
Mean $\pm$ S.D.	1.1 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.2

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

**: significant difference from control, $p < 0.01$ # : significant difference from control, $p < 0.05$ (Fisher exact test)

Table 12

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Reproductive performance

Compound	HNA			
	0 a)	12.5	50	200
Number of males examined (A)	24	24	24	25
Number of males copulated (B)	24	24	24	25
Copulation index; males [(B/A)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile males (C)	24	24	24	25
Fertility index; males [(C/B)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation; males Mean ± S.D.	3.3 ± 2.6	3.0 ± 1.4	3.0 ± 1.0	2.6 ± 1.3
Number of females examined (D)	25	25	25	25
Number of females copulated (E)	25	25	25	25
Copulation index; females [(E/D)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile females (F)	25	25	25	25
Fertility index; females [(F/E)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation; females Mean ± S.D.	3.2 ± 2.6	3.1 ± 1.5	3.0 ± 1.0	2.6 ± 1.3

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

Table 13

HNA: one-generation reproduction toxicity study in rats

Hematological findings of F0 males after oral administration for 98 days

Compound	HNA			
	0 ^{a)}	12.5	50	200
Number of animals examined	24	24	24	25
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	817 $\pm$ 43	841 $\pm$ 42	866 $\pm$ 45 **	885 $\pm$ 41 **
WBC ($\times 100/\text{mm}^3$)	70 $\pm$ 18	53 $\pm$ 13 **	52 $\pm$ 15 **	83 $\pm$ 20 *
Band neutrophil (%)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Segmented neutrophil (%)	10 $\pm$ 5	12 $\pm$ 6	16 $\pm$ 7 **	11 $\pm$ 5
Eosinophil (%)	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1
Basophil (%)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte (%)	3 $\pm$ 3	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 3
Lymphocyte (%)	86 $\pm$ 5	83 $\pm$ 7	79 $\pm$ 8 **	86 $\pm$ 7

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

parameters represented mean $\pm$ S.D.* : significant difference from control, $p < 0.05$ **: significant difference from control, $p < 0.01$

Table 14
HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats
Summary of macroscopic findings in Fo males at the end of the dosing period

Group	0 mg/kg			12.5 mg/kg			50 mg/kg			200 mg/kg		
Grade	-	+		-	+		-	+		-	+	
(Testis)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Small, unilateral	24	0		24	0		23	1		25	0	
(Epididymis)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Small, unilateral	24	0		24	0		23	1		25	0	
(Stomach)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Spot, brown, mucosa, glandular stomach	24	0		24	0		24	0		25	0	
Area, thickening, mucosa, forestomach	24	0		24	0		24	0		19	6	
Area, whitish cloudy/white, mucosa, forestomach	24	0		24	0		24	0		23	2	
(Liver)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Diaphragmatic nodule	23	1		24	0		24	0		25	0	
Enlargement	24	0		24	0		24	0		22	3	
(Kidney)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Dilatation, renal pelvis, unilateral/bilateral	24	0		22	2		24	0		25	0	
(Adrenal gland)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Area, pale, left side	24	0		24	0		23	1		25	0	
Dark	24	0		24	0		23	1		25	0	
(Brain)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Pale	24	0		24	0		24	0		25	0	
Area, dark red/dark, pachymeninx	24	0		24	0		24	0		25	0	
Adhesion, pachymeninx, with leptomeninx	24	0		24	0		24	0		25	0	
(Heart)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Adhesion, epicardium, with pericardium	24	0		24	0		24	0		25	0	
Adhesion, epicardium, with pleura of lung	24	0		24	0		24	0		25	0	
Thickening, epicardium	24	0		24	0		24	0		25	0	
Whitish cloudy, epicardium	24	0		24	0		24	0		25	0	
(Thymus)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Small	24	0		24	0		24	0		25	0	
Dark	24	0		24	0		24	0		25	0	
(Spleen)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Enlargement	24	0		24	0		24	0		25	0	
Pale	24	0		24	0		24	0		25	0	
Hemorrhage	24	0		24	0		24	0		25	0	
Adhesion, with peritoneum	24	0		24	0		24	0		25	0	
(Lymph node)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Enlargement	24	0		24	0		24	0		25	0	
(Bone marrow of femur)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Pale	24	0		24	0		24	0		25	0	
(Skin)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Soiled fur	24	0		24	0		24	0		25	0	
(Abdominal cavity)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Hemorrhage	24	0		24	0		24	0		25	0	
(Oral cavity & Tooth)	[24]			[24]			[24]			[25]		
Malocclusion	24	0		24	0		24	0		25	0	
Crushing of teeth	24	0		24	0		24	0		25	0	
Wound of palate	24	0		24	0		24	0		25	0	

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined /

Table 14-S/D

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of macroscopic findings in F0 males sacrificed in a moribund condition or died

Group Grade	0 mg/kg			12.5 mg/kg			50 mg/kg			200 mg/kg		
	-	+		-	+		-	+		-	+	
(Testis)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Small, unilateral		1	0		1	0		1	0			
(Epididymis)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Small, unilateral		1	0		1	0		1	0			
(Stomach)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Spot, brown, mucosa, glandular stomach		1	0		1	0		0	1			
Area, thickening, mucosa, forestomach		1	0		1	0		1	0			
Area, whitish cloudy/white, mucosa, forestomach		1	0		1	0		1	0			
(Liver)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Diaphragmatic nodule		1	0		1	0		1	0			
Enlargement		1	0		1	0		1	0			
(Kidney)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Dilatation, renal pelvis, unilateral/bilateral		1	0		1	0		1	0			
(Adrenal gland)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Area, pale, left side		1	0		1	0		1	0			
Dark		1	0		1	0		1	0			
(Brain)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Pale		1	0		0	1		1	0			
Area, dark red/dark, pachymeninx		1	0		0	1		0	1			
Adhesion, pachymeninx, with leptomeninx		1	0		1	0		0	1			
(Heart)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Adhesion, epicardium, with pericardium		1	0		1	0		0	1			
Adhesion, epicardium, with pleura of lung		1	0		1	0		0	1			
Thickening, epicardium		1	0		1	0		0	1			
Whitish cloudy, epicardium		1	0		1	0		0	1			
(Thymus)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Small		1	0		0	1		1	0			
Dark		1	0		1	0		0	1			
(Spleen)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Enlargement		1	0		0	1		0	1			
Pale		1	0		1	0		0	1			
Hemorrhage		1	0		1	0		0	1			
Adhesion, with peritoneum		1	0		1	0		0	1			
(Lymph node)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Enlargement		1	0		0	1		0	1			
(Bone marrow of femur)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Pale		1	0		0	1		1	0			
(Skin)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Soiled fur		1	0		0	1		0	1			
(Abdominal cavity)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Hemorrhage		1	0		1	0		0	1			
(Oral cavity & Tooth)	[1]			[1]			[1]			[0]		
Malocclusion		0	1		1	0		1	0			
Crushing of teeth		0	1		1	0		1	0			
Wound of palate		0	1		1	0		1	0			

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 15
 HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats
 Summary of histopathological findings in Fo males at the end of the dosing period

Group	0 mg/kg						12.5 mg/kg						50 mg/kg						200 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Pituitary gland)	[24]						[0]						[0]						[25]					
Dilatation, Rathke's cleft	23	0	1	0	0	1													24	1	0	0	0	1
(Testis)	[24]						[0]						[1]						[25]					
Atrophy, seminiferous tubule,																								
unilateral	24	0	0	0	0	0							0	0	0	0	1	1	25	0	0	0	0	0
Atrophy, Leydig cell,																								
unilateral	24	0	0	0	0	0							0	0	1	0	0	1	25	0	0	0	0	0
Edema, interstitium,																								
unilateral	24	0	0	0	0	0							0	0	0	0	1	1	25	0	0	0	0	0
(Epididymis)	[24]						[0]						[1]						[25]					
Decrease, sperm, lumen	24	0	0	0	0	0							0	0	0	0	1	1	25	0	0	0	0	0
Cell debris, lumen	24	0	0	0	0	0							0	1	0	0	0	1	25	0	0	0	0	0
(Seminal vesicle)	[24]						[0]						[0]						[25]					
No remarkable change																								
(Prostate: ventral lobe)	[24]						[0]						[0]						[25]					
Cellular infiltration,																								
lymphocyte, interstitium	10	5	6	3	0	14													20	2	2	1	0**	5##
Cellular infiltration, neutrophil,																								
epithelium & lumen	21	1	2	0	0	3													25	0	0	0	0	0
(Coagulating gland)	[24]						[0]						[0]						[25]					
No remarkable change																								
(Stomach)	[24]						[24]						[24]						[25]					
Squamous hyperplasia,																								
forestomach	24	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	20	4	0	0	0*	4	0	21	3	1	0**	25##
(Adrenal gland)	[24]						[0]						[2]						[25]					
Fibrosis, focal, capsule	23	0	1	0	0	1							2	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0
(Liver)	[24]						[24]						[24]						[25]					
Spongiosis hepatis	23	0	1	0	0	1	24	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0
Fatty change, periportal	21	0	3	0	0	3	23	0	1	0	0	1	23	0	1	0	0	1	25	0	0	0	0	0
Leukemic cell	24	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0
(Spleen)	[24]						[24]						[24]						[25]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	2	22	0	0	24	0	4	20	0	0	24	0	0	24	0	0	24	0	1	24	0	0	25
Deposit, pigment, brown	0	1	14	9	0	24	0	1	16	7	0	24	0	0	10	14	0	24	0	0	12	13	0	25
Leukemic cell	24	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0
(Bone marrow of femur)	[24]						[24]						[24]						[25]					
Leukemic cell	24	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0
(Hematopoietic system)	[24]						[24]						[24]						[25]					
Leukemia, myeloid	24	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0
(Kidney)	[0]						[2]						[0]						[0]					
Dilatation, renal pelvis							0	0	2	0	0	2												
Eosinophilic body							1	0	1	0	0	1												
Basophilic tubule, cortex							0	1	1	0	0	2												
Cyst,																								
cortico-medullary junction							1	0	1	0	0	1												
Mineralization							1	1	0	0	0	1												

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

[], Number of animals examined

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

**, Significantly different from control $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

#, Significantly different from control $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

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

Table 15-S/D

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of histopathological findings in Fo males sacrificed in a moribund condition or died

Group	0 mg/kg						12.5 mg/kg						50 mg/kg						200 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Pituitary gland)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Dilatation, Rathke's cleft	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
(Testis)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Atrophy, seminiferous tubule,																								
unilateral	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
Atrophy, Leydig cell,																								
unilateral	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
Edema, interstitium,																								
unilateral	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
(Epididymis)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Decrease, sperm, lumen	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
Cell debris, lumen	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
(Seminal vesicle)	[1]						[1]						[1]						[0]					
No remarkable change																								
(Prostate: ventral lobe)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Cellular infiltration,																								
lymphocyte, interstitium	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
Cellular infiltration, neutrophil,																								
epithelium & lumen	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
(Coagulating gland)	[1]						[1]						[1]						[0]					
No remarkable change																								
(Stomach)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Squamous hyperplasia,																								
forestomach	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
(Adrenal gland)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Fibrosis, focal, capsule	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
(Liver)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Spongiosis hepatitis	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
Fatty change, periportal	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
Leukemic cell	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1						
(Spleen)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
Deposit, pigment, brown	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0						
Leukemic cell	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1						
(Bone marrow of femur)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Leukemic cell	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1						
(Hematopoietic system)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Leukemia, myeloid	tumor= 0(0.0%)						tumor= 1(4.0%)						tumor= 1(4.0%)											
(Kidney)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Dilatation, renal pelvis																								
Eosinophilic body																								
Basophilic tubule, cortex																								
Cyst,																								
cortico-medullary junction																								
Mineralization																								

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

[], Number of animals examined

Table 16
 HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats
 Summary of macroscopic findings of in females

Group Grade	0 mg/kg		12.5 mg/kg		50 mg/kg		200 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Uterus)	[25]		[25]		[25]		[25]	
Enlargement, horn, unilateral	25	0	25	0	25	0	24	1
(Oviduct)	[25]		[25]		[25]		[25]	
Nodule	25	0	25	0	25	0	24	1
(Stomach)	[25]		[25]		[25]		[25]	
Area, thickening, mucosa, forestomach	25	0	25	0	25	0	24	1
(Kidney)	[25]		[25]		[25]		[25]	
Dilatation, renal pelvis, bilateral	25	0	25	0	24	1	24	1

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

Table 17
 HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats
 Summary of histopathological findings in Fo females

Group Grade	0 mg/kg						12.5 mg/kg						50 mg/kg						200 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Pituitary gland)	[25]						[0]						[0]						[25]					
No remarkable change																								
(Ovary)	[25]						[0]						[0]						[25]					
No remarkable change																								
(Uterus: horn & cervix)	[25]						[0]						[0]						[25]					
No remarkable change																								
(Vagina)	[25]						[0]						[0]						[25]					
Cyst, lamina propria	25																		24					
(Stomach)	[25]						[25]						[24]						[25]					
Squamous hyperplasia, forestomach	25						25						24						17					
(Adrenal gland)	[25]						[0]						[0]						[25]					
No remarkable change																								
(Oviduct)	[0]						[0]						[0]						[1]					
Dilatation, cystic, lumen																			0					
Cellular infiltration, neutrophil, epithelium & lamina propria																			0					
(Kidney)	[0]						[0]						[1]						[1]					
Dilatation, renal pelvis													0						0					
Basophilic tubule, cortex													0						0					
Hyperplasia, transitional epithelium, renal pelvis													1						0					

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

[], Number of animals examined

**, Significantly different from control $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

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

Table 18

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Development of F₁ pups up to day 21 after birth; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	HNA			
	0 ^{a)}	12.5	50	200
Number of pregnant females	25	25	25	25
Number of pregnant females with live newborns	25	25	25	25
Gestation index	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length in days	22.4 $\pm$ 0.5 (25)	22.2 $\pm$ 0.5 (25)	22.4 $\pm$ 0.5 (25)	22.2 $\pm$ 0.4 (25)
Number of implantations	14.8 $\pm$ 3.4 (25)	14.8 $\pm$ 3.5 (25)	15.2 $\pm$ 2.6 (25)	15.1 $\pm$ 2.3 (25)
Day 0 of lactation				
Number of newborns	13.8 $\pm$ 3.2 (25)	13.5 $\pm$ 3.3 (25)	14.3 $\pm$ 2.8 (25)	14.4 $\pm$ 2.3 (25)
Delivery index	93.7 $\pm$ 7.4 (25)	91.5 $\pm$ 7.6 (25)	93.9 $\pm$ 8.1 (25)	95.3 $\pm$ 6.1 (25)
Number of live newborns	13.6 $\pm$ 3.2 (25)	13.4 $\pm$ 3.2 (25)	14.1 $\pm$ 2.7 (25)	14.2 $\pm$ 2.3 (25)
Birth index	92.5 $\pm$ 8.2 (25)	90.9 $\pm$ 8.0 (25)	92.7 $\pm$ 8.0 (25)	94.6 $\pm$ 6.7 (25)
Live birth index	98.7 $\pm$ 4.6 (25)	99.3 $\pm$ 3.3 (25)	98.8 $\pm$ 3.8 (25)	99.2 $\pm$ 2.3 (25)
Sex ratio on day 0	49.8 $\pm$ 15.6 (25)	52.2 $\pm$ 18.0 (25)	44.1 $\pm$ 13.6 (25)	53.2 $\pm$ 15.9 (25)
Day 4 of lactation				
Number of live pups before adjustment of litter size	13.5 $\pm$ 3.1 (25)	13.2 $\pm$ 3.1 (25)	14.1 $\pm$ 2.7 (25)	14.2 $\pm$ 2.3 (25)
Viability index	99.2 $\pm$ 2.9 (25)	99.2 $\pm$ 2.1 (25)	100.0 $\pm$ 0.0 (25)	99.5 $\pm$ 1.9 (25)
Sex ratio on day 4	50.1 $\pm$ 15.8 (25)	52.1 $\pm$ 17.9 (25)	44.1 $\pm$ 13.6 (25)	53.4 $\pm$ 15.7 (25)
Number of live pups after adjustment of litter size	7.8 $\pm$ 1.0 (25)	7.7 $\pm$ 1.0 (25)	7.9 $\pm$ 0.6 (25)	8.0 $\pm$ 0.2 (25)
Day 21 of lactation				
Number of live pups	7.8 $\pm$ 1.0 (25)	7.7 $\pm$ 1.0 (25)	7.9 $\pm$ 0.6 (25)	8.0 $\pm$ 0.2 (25)
Weaning index	100.0 $\pm$ 0.0 (25)	99.5 $\pm$ 2.5 (25)	100.0 $\pm$ 0.0 (25)	100.0 $\pm$ 0.0 (25)

Gestation index = (number of pregnant females with live newborns/number of pregnant females) $\times$ 100, %Delivery index = (number of newborns/number of implantations) $\times$ 100, %Birth index = (number of live newborns/number of implantations) $\times$ 100, %Live birth index = (number of live newborns/number of newborns) $\times$ 100, %Sex ratio on day 0 = (number of male live newborns/number of live newborn) $\times$ 100, %Viability index = (number of live pups on day 4 before adjustment of litter size/number of live newborns) $\times$ 100, %Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 before adjustment of litter size/number of live pups on day 4 before adjustment of litter size) $\times$ 100, %Weaning index = (number of live pups on day 21 of lactation/number of live pups on day 4 after adjustment of litter size) $\times$ 100, %

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

Table 19

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Body weight of F₁ pups up to day 21 after birth; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compounds	HNA			
	a) 0	12.5	50	200
Day 0 (At birth)				
No. of live newborns	13.6 $\pm$ 3.2 (25)	13.4 $\pm$ 3.2 (25)	14.1 $\pm$ 2.7 (25)	14.2 $\pm$ 2.3 (25)
Male	6.8 $\pm$ 2.6	6.9 $\pm$ 2.5	6.2 $\pm$ 2.1	7.5 $\pm$ 2.4
Female	6.8 $\pm$ 2.9	6.5 $\pm$ 2.5	8.0 $\pm$ 2.5	6.8 $\pm$ 2.8
Weight of newborns in grams				
Male	6.9 $\pm$ 0.8	6.8 $\pm$ 0.8	6.8 $\pm$ 0.8	5.8 $\pm$ 0.6 **
Female	6.5 $\pm$ 0.7	6.4 $\pm$ 0.6	6.5 $\pm$ 0.7	5.6 $\pm$ 0.5 **
Day 4				
No. of live pups ^{b)}	7.8 $\pm$ 1.0 (25)	7.7 $\pm$ 1.0 (25)	7.9 $\pm$ 0.6 (25)	8.0 $\pm$ 0.2 (25)
Male	4.0 $\pm$ 0.7	3.9 $\pm$ 0.8	3.9 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.5
Female	3.8 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 1.0	4.0 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.6
Weight of pup in grams				
Male	11.5 $\pm$ 1.4	11.6 $\pm$ 1.5	11.5 $\pm$ 1.9	10.2 $\pm$ 1.1 **
Female	11.0 $\pm$ 1.3	11.1 $\pm$ 1.4	11.0 $\pm$ 1.6	9.8 $\pm$ 1.0 **
Day 7				
No. of live pups	7.8 $\pm$ 1.0 (25)	7.7 $\pm$ 1.0 (25)	7.9 $\pm$ 0.6 (25)	8.0 $\pm$ 0.2 (25)
Male	4.0 $\pm$ 0.7	3.9 $\pm$ 0.8	3.9 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.5
Female	3.8 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 1.0	4.0 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.6
Weight of pup in grams				
Male	18.7 $\pm$ 1.6	18.8 $\pm$ 1.9	18.4 $\pm$ 2.1	16.7 $\pm$ 1.7 **
Female	17.8 $\pm$ 1.7	18.0 $\pm$ 1.8	17.7 $\pm$ 1.9	16.1 $\pm$ 1.4 **

Parentheses indicate the number of litters evaluated

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

b): after adjustment of litter size

**: significant difference from control, p<0.01

Table 19 (continued)

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Body weight of F₁ pups up to day 21 after birth; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compounds		HNA			
Dose (mg/kg)		0 ^{a)}	12.5	50	200
Day 14					
No. of live pups		7.8 $\pm$ 1.0 (25)	7.7 $\pm$ 1.0 (25)	7.9 $\pm$ 0.6 (25)	8.0 $\pm$ 0.2 (25)
Male		4.0 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.5
Female		3.8 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 1.0	4.0 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.6
Weight of pup in grams					
Male		37.7 $\pm$ 2.6	38.1 $\pm$ 2.7	37.7 $\pm$ 2.8	34.7 $\pm$ 2.4 **
Female		36.4 $\pm$ 2.5	37.1 $\pm$ 3.1	36.6 $\pm$ 2.4	33.7 $\pm$ 2.0 **
Day 21					
No. of live pups		7.8 $\pm$ 1.0 (25)	7.7 $\pm$ 1.0 (25)	7.9 $\pm$ 0.6 (25)	8.0 $\pm$ 0.2 (25)
Male		4.0 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.5
Female		3.8 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 1.0	4.0 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.6
Weight of pup in grams					
Male		63.1 $\pm$ 4.5	63.2 $\pm$ 5.5	63.5 $\pm$ 5.0	56.2 $\pm$ 4.1 **
Female		60.4 $\pm$ 4.3	60.5 $\pm$ 5.2	61.0 $\pm$ 3.9	54.6 $\pm$ 3.4 **

Parentheses indicate the number of litters evaluated

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

**: significant difference from control, p<0.01

Table 20

HNA: One-generation reproduction toxicity study in rats

Morphological findings of F₁ offspring

Compound	HNA			
	0 ^{a)}	12.5	50	200
Dead pups				
Number of dead pups examined :				
<u>External observation</u>	5	3	1	4
<u>Visceral observation</u>	2	3	1	3
<u>External changes</u>				
Number of pups	0	0	0	1
Types and number				
Microphthalmia	0	0	0	1 b)
<u>Visceral changes</u>				
Number of pups	0	0	0	2
Types and number				
Diaphragmatic hernia	0	0	0	1 c)
Hypoplasia of the spleen	0	0	0	1 b)
Undescended testes	0	0	0	1 b)
Day 4 (eliminated pups to adjust litter size)				
Number of live pups examined	142	138	156	150
<u>External changes</u>				
Number of pups	0	0	0	5
Types and number				
Brachyury	0	0	0	4 d)
Brachyury and kinked tail	0	0	0	1 d)
<u>Visceral changes</u>				
Number of pups	0	0	0	0
Day 21 (at weaning)				
Number of live weanlings examined	195	192	197	199
<u>External changes</u>				
Number of weanlings	0	1	0	2
Types and number				
Brachyury	0	1 e)	0	1 d)
Kinked tail	0	0	0	1 d)
<u>Visceral changes</u>				
Number of weanlings	0	0	2	0
Types and number				
Dilatation of the renal pelvis	0	0	2 f)	0
Total number :				
<u>External observation</u>	342	333	354	353
<u>External changes</u>	0	1 e)	0	8**b,d)
<u>Visceral observation</u>	339	333	354	352
<u>Visceral changes</u>	0	0	2 f)	2 c,b)

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

b): FB04021 (Dam no.)

c): FB04012 (Dam no.)

**): significant difference from control, p<0.01

d): FB04015 (Dam no.)

e): FB02003 (Dam no.)

f): FB03004 (Dam no.)