

最終報告書

o-アセトアセトトルイジドのラットを用いる反復
経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験
(試験番号 97-079-2)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要約	1
緒言	2
目的	2
材料および方法	
1. 被験物質	2
2. 供試動物および飼育条件	3
3. 群分けおよび個体識別	3
4. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法	3
5. 観察および検査	
1) 親動物に関する項目	
(1) 一般状態観察	4
(2) 体重および摂餌量測定	4
(3) 交配および分娩状態観察	5
(4) 臨床病理学検査	5
(5) 病理学検査	8
2) 新生児に関する項目	
(1) 産児数および性比の観察	9
(2) 外表異常および一般状態観察	9
(3) 体重測定	9
(4) 病理学検査	9
6. 統計処理	9
結果	
1. 反復投与毒性	
1) 死亡動物	10
2) 一般状態	10
3) 体重	10
4) 摂餌量	10
5) 雄の尿検査	10
6) 雄の血液学検査	10
7) 雄の血液生化学検査	10
8) 剖検	11
9) 器官重量	11

10) 病理組織学検査	1 1
2. 生殖発生毒性	
1) 親動物に及ぼす影響	
(1) 交尾率および受胎率	1 2
(2) 黄体数、着床数および着床率	1 2
(3) 出産率および妊娠期間	1 2
(4) 分娩および哺育状態	1 2
2) 新生児に及ぼす影響	
(1) 生存性および体重	1 2
(2) 形態	1 3
考察および結論	
1. 反復投与毒性	1 3
2. 生殖発生毒性	1 5
文献	1 5

添付資料

A. 図・群別平均値表

Figures 1, 2	体重	1
Figures 3, 4	摂餌量	3
Tables 1, 2	死亡率	5
Tables 3, 4	一般状態	7
Tables 5, 6	体重	9
Tables 7, 8	摂餌量	1 1
Table 9	尿所見	1 3
Table 10	血液学検査	1 5
Table 11	血液生化学検査	1 6
Tables 12, 13	剖検検査	1 7
Tables 14, 15	器官重量	1 9
Tables 16, 17	病理組織学検査	2 1
Table 18	生殖に及ぼす影響	2 7
Table 19	新生児に及ぼす影響	2 8
Table 20	新生児の外表検査	2 9
Table 21	新生児の内臓検査	3 0

要約

ハンザエローやベンジジンエローなどのアゾ顔料の合成原料等に用いられている *o*-アセトアセトトルイジドについて、反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を、SD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用い、0、8、25、80および250mg/kg/day用量で実施した。動物は1群雌雄各10匹とし、被験物質は交配開始14日前から雄は44日間、雌は分娩後哺育3日(41-45日間)まで投与した。

1. 反復投与毒性

雄親について、血液学検査では、80mg/kg以上の群で赤血球数の減少、平均赤血球容積の増加、さらに250mg/kg群でヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少、平均赤血球色素量および網状赤血球数の増加、メトヘモグロビン含有率の増加傾向、ハインツ小体保有赤血球の出現が認められた。血液生化学検査では、80mg/kg以上の群でビリルビンの増加、250mg/kg群でカリウムの増加が認められた。剖検では、80mg/kg以上の群で脾臓の黒色化が認められた。器官重量では、250mg/kg群で脾臓および下垂体の絶対および相対重量の増加が認められた。病理組織学検査では、80mg/kg以上の群で肝臓にベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着、脾臓にベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着の程度の増加、250mg/kg群で脾臓に髄外造血の程度の増加および鬱血、腎臓に近位尿細管上皮における好酸体(PAS染色陰性)の出現率の増加が認められた。下垂体には、病理組織学的変化は認められなかった。

一方、雌親についても、病理学検査で雄親と類似した変化が認められた。すなわち、80mg/kg以上の群で、脾臓の黒色化、ベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着の程度の増加および鬱血、肝臓にベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着、さらに250mg/kg群で脾臓の腫大、絶対および相対重量の増加、髄外造血の程度の増加が認められ、また肝臓の絶対重量の増加傾向および相対重量の増加が認められた。

以上の結果から、*o*-アセトアセトトルイジドのラットにおける主な反復投与毒性は、溶血性貧血およびそれと関連する変化であった。また、雌の肝臓および雄の腎臓に対しても軽度な影響が認められた。無影響量は雌雄とも25mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

雌雄親の生殖能および児動物の発生について、変化は認められなかった。したがって、雌雄親の生殖能および児動物の発生に対する無影響量は250mg/kg/day以上と推定された。

緒言

o-アセトアセトトルイジドは、o-トルイジンのアミノ基がアシル化された化学構造を有し、o-トルイジンとジケテンから合成され、ハンザエローやベンジジンエローなどのアゾ顔料の合成原料として用いられる物質¹⁾である。o-トルイジンの毒性について、ラットへの反復投与によりメトヘモグロビン血症およびそれに伴う溶血性貧血を起こすことが知られている²⁾。しかしながら、o-アセトアセトトルイジドの毒性については、単回経口投与毒性についての報告³⁾は認められるが、反復投与毒性および生殖発生毒性に関する報告はみあたらない。

この試験は、OECDにおける高生産量既存化学物質の安全性点検プログラムの一環として、実施したものである。

目的

o-アセトアセトトルイジドを雌雄ラットに反復経口投与し、投与期間中に交配、妊娠および分娩させ、本物質の反復投与毒性ならびに生殖発生毒性を検討する。

材料および方法

1. 被験物質 (Appendices 1~4)

o-アセトアセトトルイジド (CAS No. 93-68-5) は、分子量 191.2、融点103.5℃、植物油および水に難溶な白色針状結晶である。試験には、

のもの (ロット番号 純度99.93%) を入手し、冷暗所 (4℃) で密栓保管し使用した。本物質の詳細はAppendix 1に示した。試験に用いた被験物質は使用期間中安定であったことを確認した (Appendix 2)。被験物質は溶媒として1%メチルセルロース水溶液 (メチルセルロース100cP:和光純薬工業株式会社製, ロット番号 DLH5715、TPK5604; 局方精製水: 共栄製薬株式会社製, ロット番号181107, 181124) を用いて、所定の投与用量になるような濃度の懸濁液に調製して投与液とした。これを1日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷暗所 (4℃) で密栓し、保管した。投与液は少なくとも7日間は安定であることが確認された (Appendix 3) ので、週1~2回調製し、調製後7日以内に使用した。また、初回と最後に調製した投与液について分析し、所定濃度で調製されていることを確認した (Appendix 4)。なお、被験物質の分析のうち原体の分析は、

に委託して実施した。

2. 供試動物および飼育条件 (Appendices 5~8)

動物はSD系 [Crj:CD(SD)] のSPFラットを用いた。ラットは日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県厚木市下古沢795) から雄は8週齢、雌は7週齢で搬入 (雄57匹, 雌57匹) し、12日間試験環境に馴化させ、その間に検疫を行い、発育が順調で一般健康状態の良好な雌雄各50匹を雄は9週齢、雌は8週齢で試験に供した。投与開始時の平均体重 (体重範囲) は、雄 363(343~391)g、雌 227(211~241)g であった。

ラットは、温度 21~23℃、湿度 53~64% (温度・湿度の測定結果: Appendix 5)、換気回数10回以上/時 (オールフレッシュエアー方式)、照明 12 時間 (午前6時点灯、午後6時消灯) に制御したバリアーシステム動物室 (第2室) で、個体別にステンレス製金網ケージ [260W×380D×180H(mm)] に収容し、これをステンレス製5段のラックに配して飼育した。ただし、交尾確認後の雌は、巣作り材料 [日本チャールス・リバー株式会社、ホワイトフレック (ロット番号9623)、汚染物質の分析結果: Appendix 6] を入れたポリカーボネート製ケージ [265W×426D×200H(mm)] に収容した。飼料 (日本農産工業株式会社、固型飼料ラボMRストック、ロット番号 971178、汚染物質の分析結果: Appendix 7) と水 (神奈川県営水道水を1μmカートリッジフィルター濾過後紫外線照射して使用、汚染物質の分析結果: Appendix 8) は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶 (ポリカーボネート製ケージの場合) により自由摂取させた。動物室の温度・湿度測定結果、飼料、水および巣作り材料の分析結果などから、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

3. 群分けおよび個体識別

各群の動物数は雌雄各10匹とし、各群への動物の割り付けは投与開始日 (投与前) の体重に基づく層化無作為抽出法により行い、各群の体重分布が均一化するようにした。群分け後の動物の個体識別は耳パンチ法により行い、ラックおよびケージには標識札を貼付した。

4. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

投与量設定試験として、ラットを1群雌雄各4匹とし、o-アセトアセトトルイジドを0、50、100、250、500および1000mg/kg/dayで14日間反復経口投与した。ラットは投与7日の夕方から交配が成立するまで、雌雄各1匹ずつを同居させた。その結果、毒性影響と考え

られる主な変化は、眼球の退色、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少、総ビリルビンおよびカリウムの増加、脾臓の黒色化および重量の増加などの溶血性貧血の可能性を示唆する変化、ならびに肝臓重量の増加、総ビリルビンおよび GPT の増加、活性化部分トロンボプラスチン時間の延長傾向などの肝臓に対する影響を示唆する変化であった。さらに、副腎重量の減少および尿素窒素の増加など、副腎や腎臓に対する影響も窺われた。これらの変化は、雄では250mg/kg以上、雌では 100mg/kg 以上の群で認められた。交配成績については、交尾能に対する影響を示唆する変化は認められなかった。以上の結果から、本試験における投与量については、確実に反復投与毒性が発現すると予測される 250mg/kg/day を最高用量、毒性影響が発現しないと予測される 8 mg/kg/day を最低用量とし、これらの間に25および80mg/kg/dayの計 4 用量を設定した。

試験群の構成は、溶媒投与群（以下、対照群）、*o*-アセトアセトトルイジド 8mg/kg/day 投与群（8mg/kg 群）、同25mg/kg/day 投与群（25mg/kg 群）、同80mg/kg/day 投与群（80 mg/kg 群）、同250mg/kg/day 投与群（250mg/kg 群）の 5 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1 kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて *o*-アセトアセトトルイジドの 0.16w/v% 液（8mg/kg 群）、0.5w/v% 液（25mg/kg 群）、1.6w/v% 液（80mg/kg 群）あるいは 5.0w/v% 液（250mg/kg 群）を、雌雄とも交配開始 14 日前から雄は 44 日間、雌は分娩後の哺育 3 日（41～45 日間）まで、1 日 1 回（午前中）経口投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重に基づいて算出した。対照群には、被験物質の溶媒として用いた 1 % メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

5. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、動物の生死、外観、行動等について観察した。

(2) 体重および摂餌量測定

体重の測定は、投与開始日（投与開始直前）およびその後は 7 日間隔で行い、さらに最終投与日と屠殺日に測定した。ただし、雌の妊娠後は、妊娠 0、7、14 および 20 日と哺育 0 および 4 日に測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて翌日までの 24 時間の飼料消費量を測定した。摂餌量の最終測定は、雄は投与 43 日、雌は哺育 3 日に行った。交配期間中は摂餌量を測定しなかった。これらの測定には、電子上皿天秤（エーアンドデー社製、FY3000）

を用いた。

(3) 交配および分娩状態観察

投与15日の午後に、雄のケージに同一群内の雌を入れて1対1の組み合わせを作り、交尾が確認されるまで(4日間で全例の交尾を確認)連続同居させた。交尾の確認は毎朝一定時刻(9:30分頃)に行い、膈栓形成あるいは膈垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。分娩状態の観察も同じ時刻に行い、1腹ごとに分娩の終了が確認された日を哺育0日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について同居開始から交尾成立までの日数、交尾率〔(交尾成立動物数/同居動物数)×100〕、受胎率〔(受胎雌数/交尾成立雌数)×100〕および出産率〔(生児出産雌数/生存妊娠雌数)×100〕ならびに分娩の確認された例について妊娠期間(妊娠0日から分娩が確認された日までの日数)を算定した。

(4) 臨床病理学検査

雄について、以下の検査を実施した。

- a. 尿検査：投与39、42あるいは43日に新鮮尿を採取し、試験紙法(バイエル・三共株式会社、マルティスティックス®)によるpH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンの定性的検査を行った。また、ラットを代謝ケージに収容(約3時間)して得た蓄尿について、外観の観察、比重の測定(エルマ光学株式会社、屈折計)ならびに尿沈渣の検査〔URI-CELL®液(ケンブリッジケミカルプロダクト社)で染色して鏡検〕を行った。
- b. 血液学検査：供試血液の採取は投与期間終了翌日(投与開始45日)の解剖直前に行った。動物は採血前日の午後5時より除餌し、水のみを給与した。採血はエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行ない、以下の項目について検査した。なお、採取した血液は3分割し、その一部は3.8%クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を得、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の測定に、一部は、EDTA-2K処理してその他の血液学検査に供した。

項目 (略号)	測定法	測定機器
①赤血球数 (RBC)	電気抵抗検出方式	多項目自動血球計数 装置 [E-4000: 東亜 医用電子 (株)]
②血色素量 (Hb)	ラウリル硫酸ナトリウム- ヘモグロビン法	
③ヘマトクリット値 (Ht)	パルス検出方式	
④平均赤血球容積 (MCV)	計算値	
⑤平均赤血球血色素量 (MCH)	計算値	
⑥平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	計算値	
⑦白血球数 (WBC)	電気抵抗検出方式	
⑧血小板数 (Plat.)	電気抵抗検出方式	
⑨網状赤血球数 (Ret.)	Brilliant cresyl blue 染色した塗抹標本の鏡検	
⑩メトヘモグロビン濃度 (Met-Hb)	Evelyn-Malloy 変法*	血液凝固自動測定 装置 (KC-10A : 米 アメルング社)
⑪ハインツ小体保有 赤血球数 (Hein-B)	Neutral red-brilliant green 染色した塗抹標本の鏡検	
⑫プロトロンビン時間 (PT)	Quick一段法	
⑬活性化部分トロンボプラスチン 時間 (APTT)	エラジン酸活性化法	

*: van Kampen E. J., Zijlstra W. G., : *Adv. Clin. Chem.*, 8, 181(1965)

なお、白血球百分率算定用に血液塗抹標本を作製したが、白血球数に変化が認められなかったため、観察は実施しなかった。

c. 血液生化学検査：採取した血液の一部から血清を分離し、次の項目を測定した。

項目 (略号)	測定法	測定機器
① 総タンパク (T.P)	Biuret 法	生化学自動分析 装置 [JCA-VX- 1000 型クリナ ライザー：日本 電子(株)]
② アルブミン (Alb.)	BCG 法	
③ A/G比 (A/G)	計算値	
④ 血糖 (Glu.)	酵素法 (GK ¹⁾ -G6PDH ²⁾ -UV 系)	
⑤ トリグリセライド (T.G.)	酵素法 (LPL ³⁾ -GPO ⁴⁾ -POD ⁵⁾ 系)	
⑥ 総コレステロール (T-Cho.)	酵素法 (CES ⁶⁾ -COD ⁷⁾ -POD 系)	
⑦ 総ビリルビン (T-Bil.)	Jendrassik 法	
⑧ 尿素窒素 (BUN)	Urease-UV法	
⑨ クレアチニン (Crea.)	Jaffé 法	
⑩ GOT (GOT)	SSCC ⁸⁾ 法	
⑪ GPT (GPT)	SSCC 法	
⑫ γ -GTP (γ -GTP)	SSCC 法	
⑬ LDH (LDH)	SSCC 法	
⑭ ALP (ALP)	GSCC ⁹⁾ 法	
⑮ コリンエステラーゼ (ChE)	BTC ¹⁰⁾ -DTNB ¹¹⁾ 法	
⑯ カルシウム (Ca)	OCPC 法	
⑰ 無機リン (P)	酵素法 (PNP ¹²⁾ -XOD ¹³⁾ -POD系)	
⑱ ナトリウム (Na)	イオン電極法	電解質自動分析 装置 [NAKL-132: 東亜電波工業(株)]
⑲ カリウム (K)	イオン電極法	
⑳ 塩素 (Cl)	イオン電極法	

1) グルコキナーゼ、2) グルコース 6 リン酸脱水素酵素、3) リポプロテイン
リパーゼ、4) グリセロリン酸酸化酵素、5) ペルオキシダーゼ、6) コレステ
ロールエステラーゼ、7) コレステロールオキシダーゼ、8) スカンジナビア臨
床化学会、9) ドイツ臨床化学会、10) プチリルチオコリン、11) 5,5-ジチオビ
ス-2-ニトロ安息香酸、12) プリンヌクレオシドホスフォリラーゼ、13) キサンチ
ンオキシダーゼ

(5) 病理学検査

雄は採血に続いて、雌は哺育4日の観察終了後に、エーテル麻酔下で放血屠殺し、次の項目を検査した。なお、対照群、8, 80および250mg/kg群で各1匹認められた妊娠の成立しなかった雌については分娩予定日の4日後に、同様に屠殺して検査した。

- a. 剖検：全身諸器官を肉眼的に観察した。さらに、雌については、卵巢の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率〔(着床数/黄体数)×100〕を算定した。
- b. 器官重量測定：電子上皿天秤(メトラー社、AT 200)を用いて、雌雄の脳、下垂体、甲状腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺ならびに雄の精巣、精巣上体を秤量(絶対重量)し、対体重比(相対重量)を算出した。腎臓、副腎、精巣および精巣上体は左右を一括して、下垂体および甲状腺は固定後に秤量した。
- c. 病理組織学検査：次の器官を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣および精巣上体のみブアン液)で固定した。

脳、下垂体、眼球、ハーダー腺、甲状腺(上皮小体含む)、唾液腺、胸腺、気管、肺、心臓、舌、食道、胃、腸、肝臓、脾臓、膵臓、副腎、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巢、子宮、膣、大動脈(胸部)、脊髄(頸部、胸部、腰部)、坐骨神経、骨・骨髓(胸骨、大腿骨)、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節)、骨格筋(下腿三頭筋)、皮膚(背部)、乳腺(腹部)、その他肉眼的異常部位

病理組織学検査は、対照群および250mg/kg群の全例、ならびに他の群の妊娠の成立しなかった雌雄の脳、下垂体、甲状腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、胃、腎臓、脾臓、副腎、膀胱、骨髓、脊髄、坐骨神経、その他肉眼的異常部位、さらに雄では精巣、精巣上体について実施した。また、妊娠不成立の雌雄について、雄は前立腺および精囊、雌は卵巢および子宮についても検査した。検査は常法に従いパラフィン切片を作製し、H・E染色を施して鏡検した。また、沈着物を同定するため、雌雄全例の脾臓および肝臓については鉄染色(ベルリンプルー法)、一部の雄の腎臓についてはPAS染色を行った。8、25および80mg/kg群で妊娠の成立した雌雄については、250mg/kg群で毒性影響と考えられる変化の認められた雌雄の肝臓および脾臓、雄の腎臓ならびに肉眼的異常部位を検査した。組織標本は、株式会社組織科学研究所(東京都青梅市黒沢2丁目984-1)に委託して作製した。

2) 新生児に関する項目

(1) 産児数および性比の観察

分娩の終了後各腹の産児数（生児と死亡児の合計）を調べ、分娩率〔（総出産児数／着床数）×100〕を算定した。また、性別を肛門と生殖突起の距離の長短により判定し、群ごとの性比を算出した。

(2) 外表異常および一般状態観察

新生児について口腔内を含む外表の異常を観察した。また、毎日一般状態および生死を確認し、出生率〔（出産確認時生児数／総出産児数）×100〕および新生児生存率〔（哺育4日生児数／出産確認時生児数）×100〕を求めた。

(3) 体重測定

新生児について哺育0日および4日に雌雄別に各腹ごとの総体重を測定し、1匹当たりの平均体重を算出した。

(4) 病理学検査

死亡例はその都度、生存例は雌親の解剖時（哺育4日）にエーテル・クロロホルムで麻酔死させ、胸腹部における主要器官を肉眼的に観察した。

6. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との間の有意差（危険率5%以下）を次の方法で検定した。

体重、摂餌量、血液学および血液生化学データ、器官重量、黄体数、着床数、妊娠期間、産児数などのパラメトリックデータは、Bartlettの分散検定を行った。分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法（群の大きさが異なる場合）により対照群に対する各群の比較検定を行った。分散が一樣でない場合ならびに着床率、出生率、分娩率、新生児生存率、尿検査の定性的データなどのノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法（群の大きさが異なる場合）により対照群に対する各群の比較検定を行った。カテゴリカルデータについては、交尾率、受胎率、出産率、出産児の性比は χ^2 検定、一般状態および病理学的検査における異常例の出現率は、Fisherの直接確率法を用いた。なお、新生児に関するデータは、1腹当たりの平均を1標本とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物 (Tables 1, 2, Appendices 9, 10)

各被験物質投与群の雌雄とも、死亡は認められなかった。

2) 一般状態 (Tables 3, 4, Appendices 11, 12)

各被験物質投与群の雌雄とも、一般状態に異常は認められなかった。

3) 体重 (Figures 1, 2, Tables 5, 6, Appendices 13, 14)

各被験物質投与群の雌雄とも対照群と同様の順調な体重増加がみられ、体重および体重増加量とも対照群と比べ有意な差は認められなかった。

4) 摂餌量 (Figures 3, 4, Tables 7, 8, Appendices 15, 16)

各被験物質投与群の雌雄とも、対照群の摂餌量と比べ有意な差は認められなかった。

5) 雄の尿検査 (Table 9, Appendix 17)

250mg/kg群で、尿比重の有意な増加が認められた。その他の検査項目には、有意な変化は認められなかった。

6) 雄の血液学検査 (Table 10, Appendix 18, 背景データ : Appendix 30)

80mg/kg以上の群で赤血球数の有意な減少が認められ、平均赤血球容積は有意な高値を示した。さらに、250mg/kg群でヘモグロビン量およびヘマトクリット値の有意な減少、網状赤血球数の有意な増加ならびにハインツ小体保有赤血球の出現が認められ、平均赤血球血色素量は有意な高値を示した。また、統計学的有意差は認められなかったものの、メトヘモグロビン含有率は増加傾向を示した。

7) 雄の血液生化学検査 (Table 11, Appendix 19, 背景データ : Appendix 30)

80mg/kg以上の群で総ビリルビン、250mg/kg群でカリウムのいずれも有意な増加が認められた。

8) 剖検 (Tables 12, 13, Appendices 20, 21)

被験物質の投与と関連性がみられる変化として、脾臓の黒色化が雌雄とも80mg/kg以上の群で認められ、250mg/kg群の雌では腫大を伴う例も認められた。

その他に、雄では、肝臓に尾状葉の表面黄色顆粒状、副腎の腫大、雌では肺の赤色点、副腎の赤色化、脾臓の腹膜との癒着などが認められたが、いずれも散発的な変化で、用量依存性は認められなかった。また、被験物質の投与とは無関係に散発的に認められた妊娠不成立の雌雄について、雄では8mg/kg群の1匹に精巣の萎縮が、雌では対照群の1匹に著明な子宮腔水腫が認められた。他の例には妊娠不成立と関連する変化は認められなかった。

9) 器官重量 (Tables 14, 15, Appendices 22~25)

250mg/kg群で、雌雄に脾臓の絶対および相対重量の有意な増加が認められた。さらに、250mg/kg群で、雄に下垂体の絶対および相対重量の有意な増加が、雌に肝臓の絶対重量の増加傾向および相対重量の有意な増加が認められた。

その他に、25mg/kg群で雌の下垂体の絶対および相対重量が対照群と比べ有意に低値を示したが、用量依存性のない変化であった。

10) 病理組織学検査 (Tables 16, 17, Appendices 20, 21, Photos 1~10)

被験物質の投与に起因すると考えられる変化が、肝臓、腎臓および脾臓に認められた。

すなわち、肝臓において、80mg/kg以上の群で、雌雄に肝臓のクッパー細胞のベルリンブルー陽性ヘモジデリン沈着が認められた。腎臓において、250mg/kg群で、雄に近位尿細管上皮の好酸体(PAS染色陰性)の出現率の有意な増加が認められた。脾臓において、80mg/kg以上の群で、雌雄にベルリンブルー陽性ヘモジデリン沈着の程度の有意な増加、雌に鬱血、さらに250mg/kg群で、雌雄に髄外造血の程度の有意な増加、雄に鬱血が認められた。

その他に、被験物質の投与とは無関係に剖検において認められた肝臓の尾状葉の表面黄色顆粒状には巣状壊死、脾臓の腹膜との癒着部には炎症性癒着が認められた。副腎の赤色化および腫大と記録された当該器官には変化は認められなかった。また、散発的に発現した妊娠不成立の雌雄について、雄では剖検で精巣の萎縮が認められた8mg/kg群の雄1匹では精巣の精細管萎縮および間細胞の過形成、精巣上体の精巣上体管内精子減少および細胞残屑が認められた。また、雌では子宮腔水腫が認められた対照群の雌1匹では、子宮の内腔拡張が認められた。しかし、被験物質の投与に起因する生殖器系器官および生殖能と関

連する内分泌系器官の変化は認められなかった。

以上の変化以外にも、検査した各器官に変化が認められたが、散発的なあるいは用量依存性の認められない所見であった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響 (Table 18, Appendix 26)

(1) 交尾率および受胎率

各群とも全例に交尾が成立し、交尾率は100%であった。また、妊娠不成立動物が対照群、8, 80および250mg/kg群で認められたが、各1対のみで、受胎率にも有意な変化は認められなかった。

(2) 黄体数、着床数および着床率

各被験物質投与群の黄体数、着床数および着床率には、いずれも対照群と比べ有意差は認められなかった。

(3) 出産率および妊娠期間

出産率は、全ての群で100%であった。また、妊娠期間についても、各被験物質投与群と対照群間に有意差は認められなかった。

(4) 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態について、被験物質の投与による影響は認められなかった。哺育状態の観察において、哺育0日に80mg/kg群で、哺育1日に80および250mg/kg群でいずれも食殺が認められたが、各々1匹の雌親によるそれぞれ1匹の児動物の食殺であり、哺育2日以降の生児はいずれも生育した。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 19, Appendix 27)

各被験物質投与群の1腹当たりの総出産児数および新生児数、分娩率、出生率、性比、哺育0日および4日の体重、ならびに哺育4日新生児生存率のいずれも、対照群と比べて有意差は認められなかった。また、新生児の一般状態にも変化は認められなかった。

(2)形態 (Tables 20, 21, Appendices 28, 29)

対照群および各被験物質投与群とも、外表および内臓異常は認められなかった。内臓変異について、胸腺の頸部遺残および左臍動脈遺残が認められたが、各被験物質投与群の発現率には、対照群と比べて有意差は認められなかった。

考察および結論

1. 反復投与毒性

認められた主な変化は、溶血性貧血およびそれとの関連性が考えられる変化であった。

すなわち、雄親において、80mg/kg以上の群で赤血球数の減少および平均赤血球容積の増加、さらに、250mg/kg群ではヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少、平均赤血球色素量の増加が認められ、大球性貧血の血液像が認められた。また、250mg/kg群で末梢血中網状赤血球数および脾臓の髄外造血の程度の増加が認められたが、これらの変化は貧血に対する造血機能の代償性反応によるものと考えられた。

なお、骨髄の造血細胞には病理組織学的変化は認められなかったが、これは貧血の程度が比較的軽度であったため、組織学的には明らかな変化として観察されなかったものと推察される。

さらに、貧血と関連して、80mg/kg以上の群で総ビリルビンの増加、肝臓のクッパー細胞および脾臓にベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着あるいは沈着の増加、250mg/kg群で血清カリウムの増加、メトヘモグロビン含有率の増加傾向、ハインツ小体保有赤血球の出現、脾臓の鬱血および重量増加が認められた。

ハインツ小体保有赤血球の出現およびメトヘモグロビン含有率の増加傾向は、ヘモグロビンの異化過程に対する影響およびそれによる異常ヘモグロビンの形成を、また総ビリルビンおよびカリウムの増加、脾臓や肝臓へのベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着は、溶血を示唆する変化と考えられる。

本被験物質は、*o*-トルイジンのアミノ基がアシル化されたものであり、*o*-トルイジンはラットへの反復投与によりメトヘモグロビン血症およびそれに伴う溶血性貧血を惹起させることが報告²⁾されている。本試験では、*o*-アセトアセトトルイジドのラットへの反復投与においても、メトヘモグロビンの増加傾向が認められ、溶血性貧血の惹起されることが確認された。

さらに、溶血性貧血およびそれとの関連性が考えられる変化に加えて、250mg/kg群で腎

臓の近位尿細管上皮における好酸体(PAS染色陰性)の出現率、尿比重ならびに下垂体の絶対および相対重量のいずれも増加が認められた。

腎臓の近位尿細管上皮における好酸体(PAS染色陰性)は雄ラットに生理的に認められ、これの増加はタンパクの再吸収過程における何らかの異常を示唆する変化と考えられるが、腎機能の異常を伴う変化ではなかった。なお、尿比重の増加が認められ、腎臓の変化と関連する可能性も推察されるが、他に腎機能の異常を示唆する変化は認められず、尿量の減少を窺わせる変化も認められなかった。さらに、尿比重の増加の程度は背景データにおける正常範囲(0.9943~1.0757)内の変化であったことから、特に問題とすべき変化でないと判断される。

下垂体の絶対および相対重量の増加については、下垂体および関連する器官に病理組織学的変化は認められず、下垂体機能の異常を示唆する変化も認められなかったことから、毒性学的意義は小さいものと判断された。

一方、雌親についても、病理学検査において、80mg/kg以上の群で脾臓のベルリンブルー陽性ヘモジデリン沈着の程度の増加、鬱血、絶対および相対重量の増加、肉眼的黒色化、肝臓のベルリンブルー陽性ヘモジデリン沈着が認められ、雄親と同様の溶血性貧血と関連する変化と考えられた。さらに、肝臓の絶対重量の増加傾向および相対重量の増加が認められた。

肝臓の重量増加については、肝臓にはベルリンブルー陽性ヘモジデリンの軽度な沈着が認められたが重量に影響するような変化とは考えられず、同様にベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着が認められた雄では肝臓重量に変化は認められなかった。しかしながら、より高用量を14日間反復投与した投与量設定試験では、雌雄とも肝臓重量の増加に加え、血清GPTも増加が認められている。したがって、*o*-アセトアセトトルイジドは肝臓に対しても軽度な毒性影響を有するものと推察される。

また、被験物質の投与とは無関係に認められた妊娠不成立の雌雄において、その一部の動物には妊娠が成立しなかったことと関連する変化が生殖器系器官に認められたが、被験物質の投与と関連する生殖器系器官や内分泌系器官の変化は、認められなかった。

なお、上述の*o*-トルイジンは、膀胱粘膜に対しても毒性を有することが知られている²⁾が、*o*-アセトアセトトルイジドを投与した本試験において、膀胱粘膜に変化は認められなかった。

以上の結果から、*o*-アセトアセトトルイジドのラットにおける主な反復経口投与毒性

は、溶血性貧血およびそれと関連する変化であった。また、雌の肝臓および雄の腎臓に対しても軽度の影響が認められた。無影響量は、雌雄とも25mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

雌雄親の生殖能に対する被験物質の投与による影響について、観察した各指標とも対照群と比べ有意な変化は認められなかった。

児動物の発生について、総出産児数、新生児数、出生率、性比、新生児の体重、生存率および形態のいずれの指標にも変化は認められなかった。

以上のように、雌雄親の生殖能並びに児動物の発生に対する影響は認められなかった。したがって、無影響量は、雌雄親の生殖能および児動物の発生に対して 250mg/kg/day以上と推定された。

文献

- 1) 化学工業日報社編, "12394 の化学商品," 化学工業日報社, 東京, 1994, p547
- 2) *IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, 27, 155(1982)
- 3) *REGISTRY OF TOXIC EFFECTS OF CHEMICAL SUBSTANCES*, AK 6550000

o-アセトアセトトルイジドのラットを用いる反復
経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験
(試験番号 97-079-2)

最終報告書 添付資料 A

(図・群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

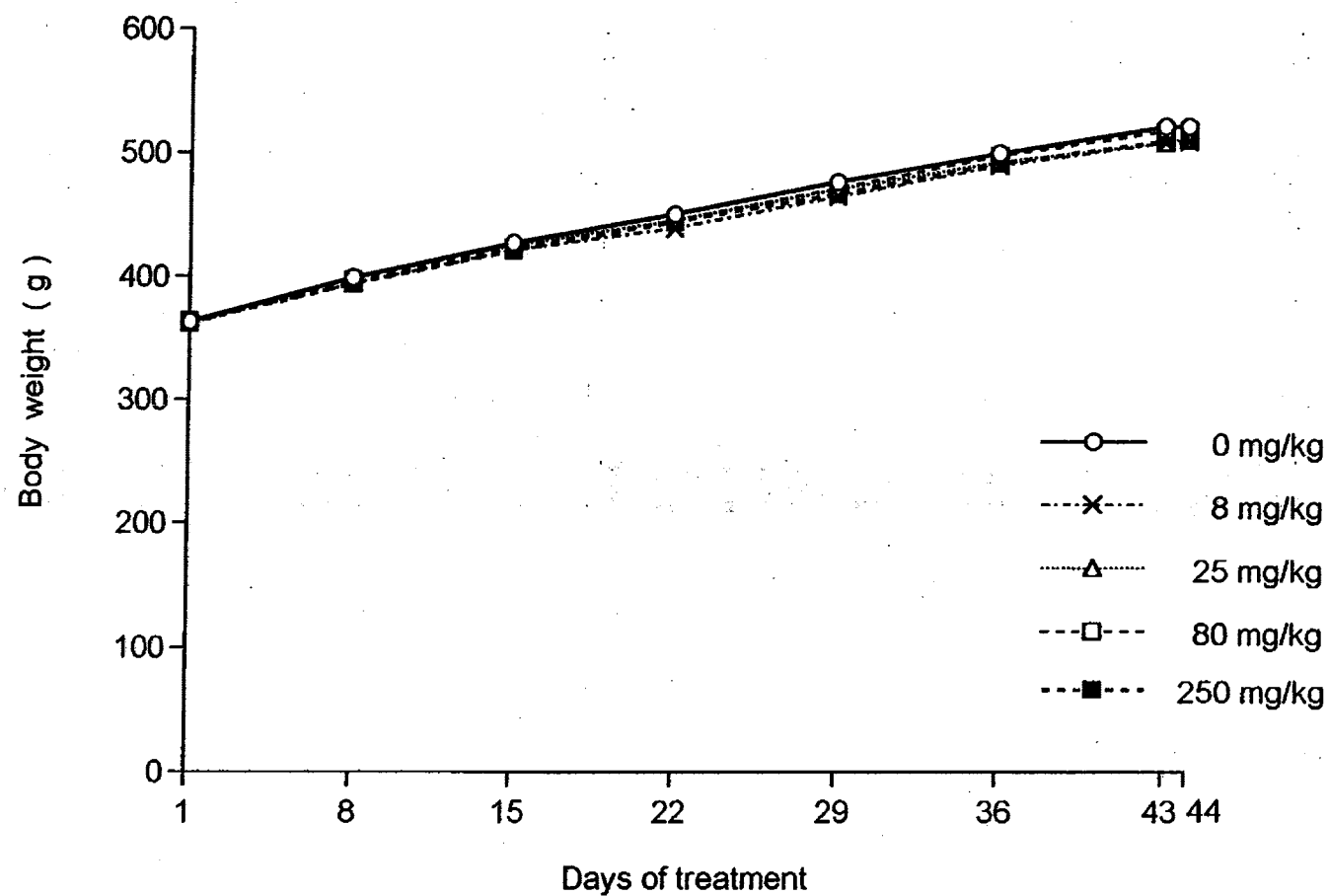


Fig.1 Body weight change in male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

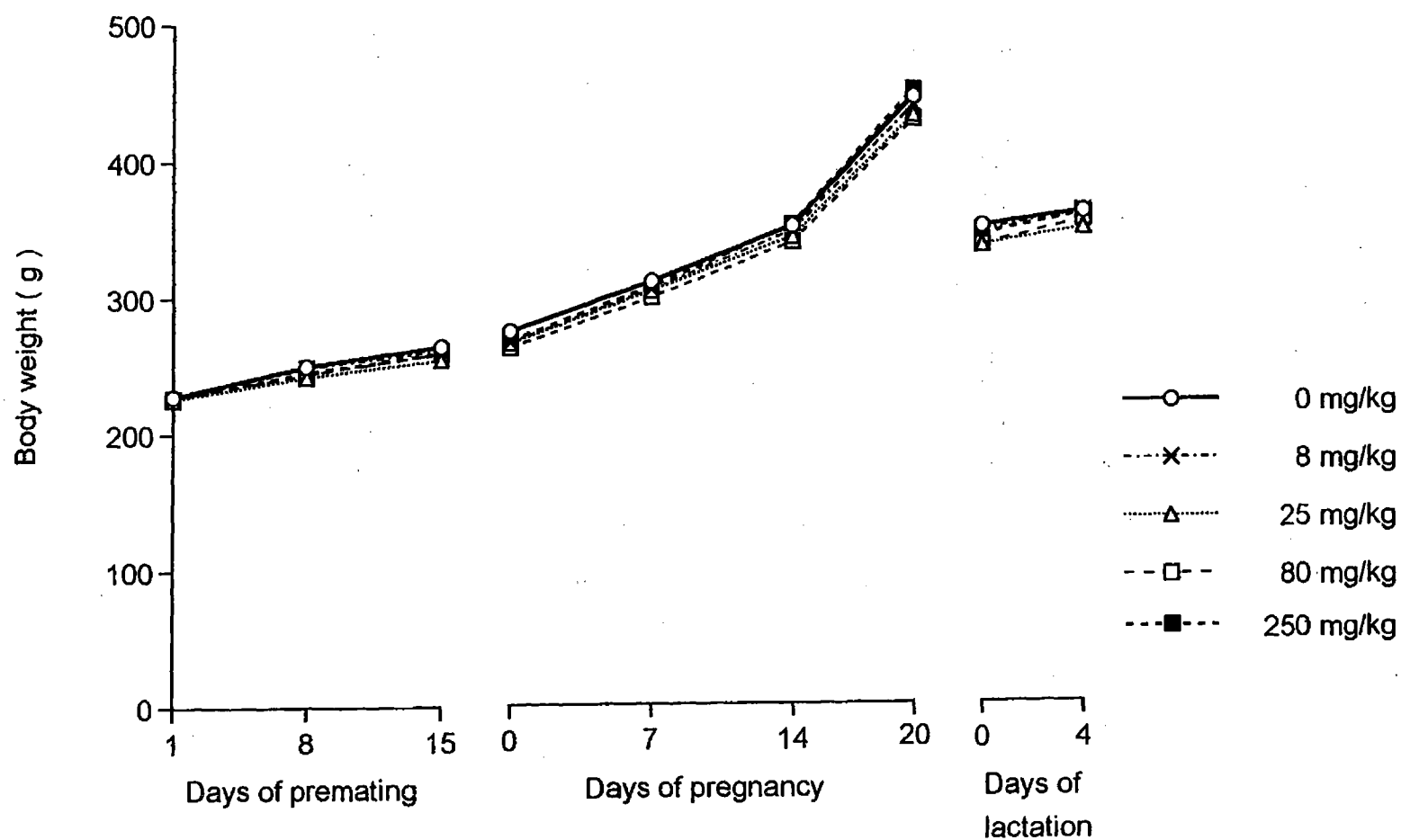


Fig. 2 Body weight change in female rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

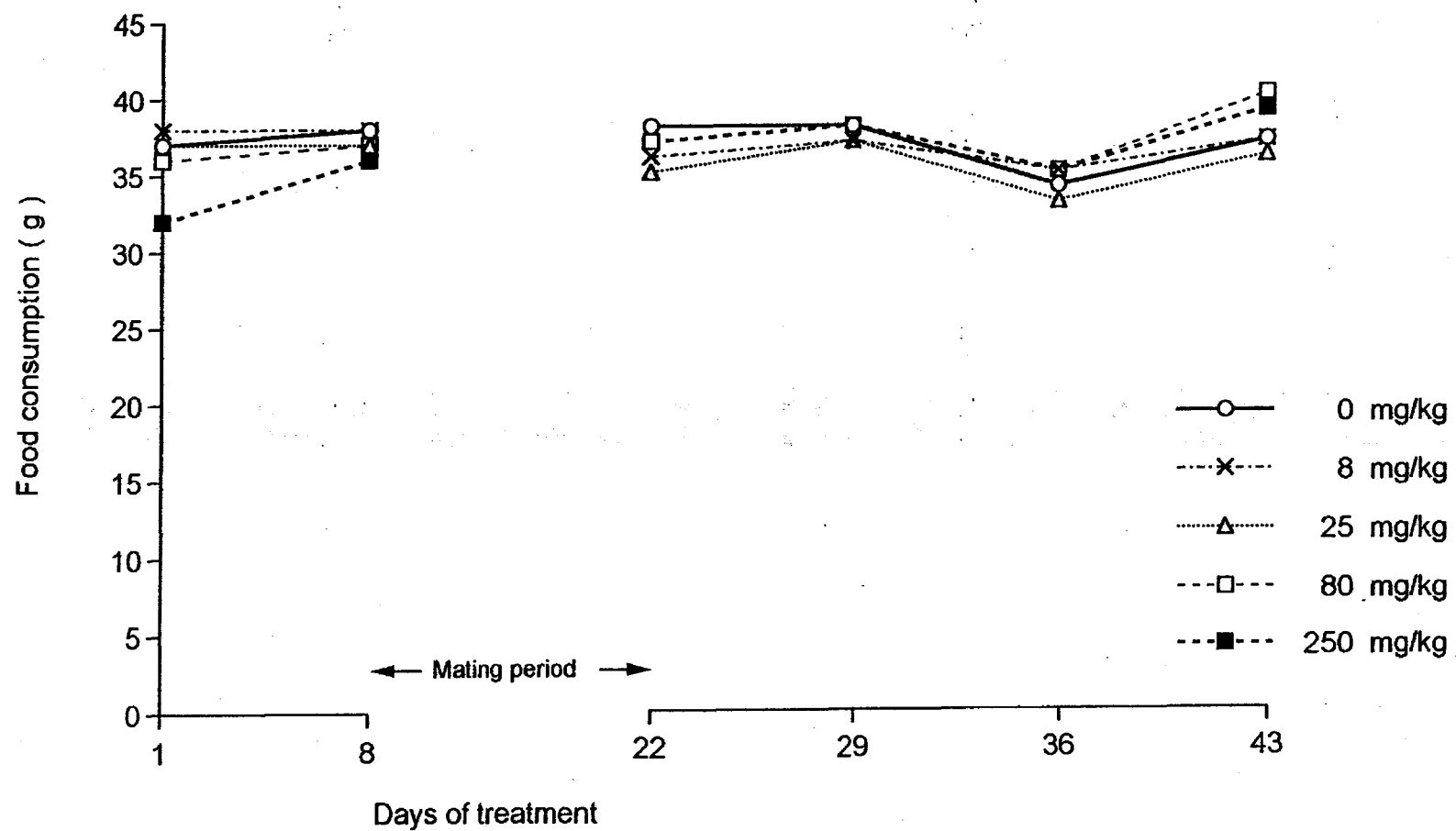


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

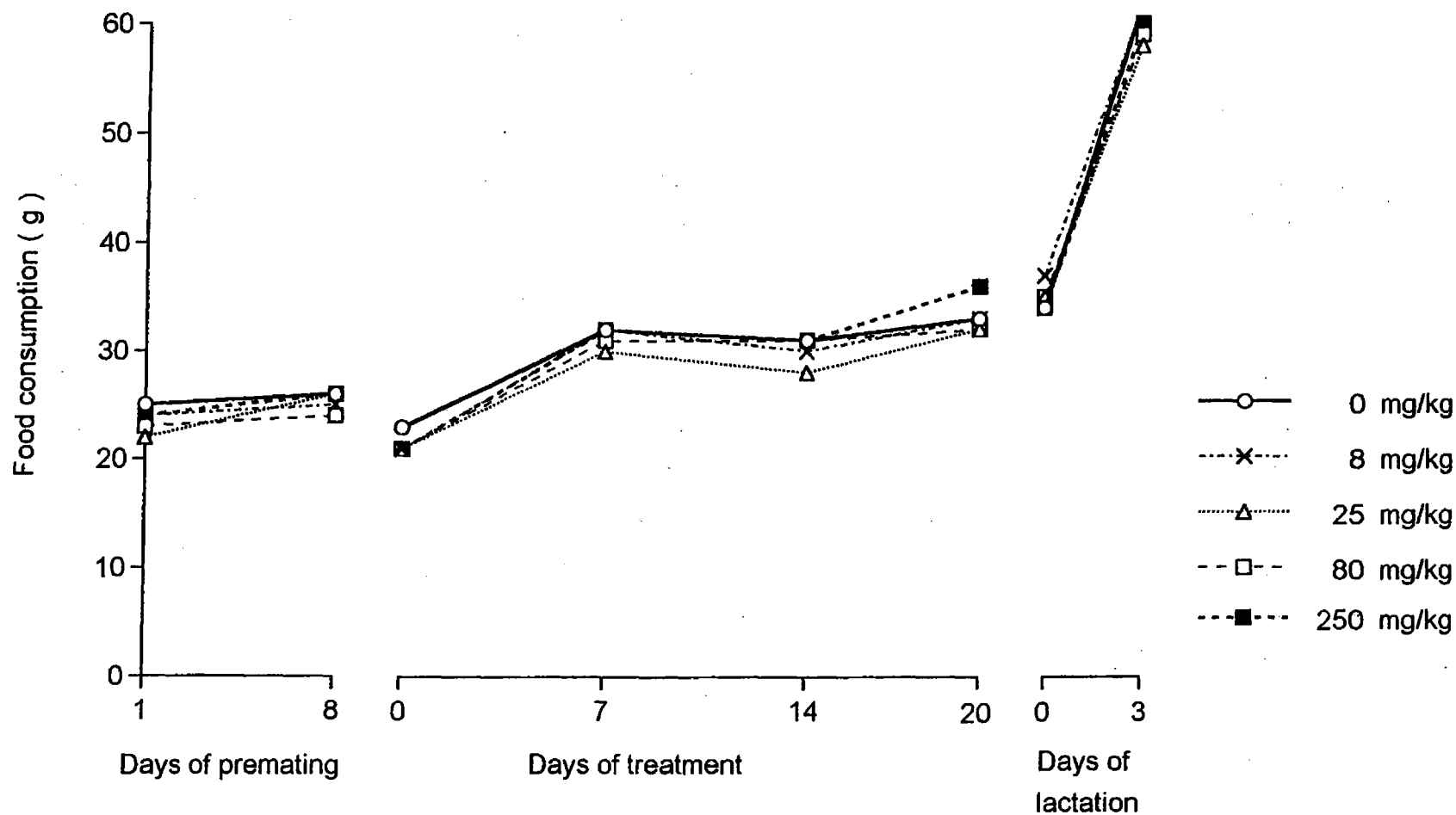


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Mortality rate of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	25	80	250
No. of animals examined	10	10	10	10	10
No. of animals that died	0	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0	0

Table 2 Mortality rate of female rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	25	80	250
No. of animals examined	10	10	10	10	10
No. of animals that died	0	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0	0

Table 3 Incidence of clinical signs of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0			8			25		80			250		
	Fate	TK	FP	(Total)	TK	FP	(Total)	TK	(Total)	TK	FP	(Total)	TK	FP	(Total)
	No. of animals	9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
Abnormalities		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)

TK : Terminal kill

FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination

Table 4 Incidence of clinical signs of female rats treated orally with o-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0			8			25		80			250		
	Fate	TK	NP	(Total)	TK	NP	(Total)	TK	(Total)	TK	NP	(Total)	TK	NP	(Total)
	No. of animals	9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
Abnormalities		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)

TK : Terminal kill

NP : Non-pregnant, killed on 26 days after copulation

Table 5 Body weights of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of treatment								Gain 1~44
	1	8	15	22	29	36	43	44	
0	363 ± 12 (10)	399 ± 15 (10)	427 ± 20 (10)	450 ± 22 (10)	476 ± 25 (10)	499 ± 28 (10)	521 ± 31 (10)	521 ± 32 (10)	158 ± 24 (10)
8	362 ± 12 (10)	394 ± 16 (10)	421 ± 20 (10)	439 ± 23 (10)	464 ± 28 (10)	489 ± 31 (10)	508 ± 31 (10)	509 ± 32 (10)	147 ± 26 (10)
25	364 ± 14 (10)	399 ± 16 (10)	425 ± 20 (10)	445 ± 20 (10)	470 ± 26 (10)	492 ± 29 (10)	508 ± 34 (10)	511 ± 33 (10)	147 ± 27 (10)
80	364 ± 13 (10)	397 ± 19 (10)	423 ± 22 (10)	445 ± 23 (10)	471 ± 25 (10)	497 ± 26 (10)	517 ± 31 (10)	518 ± 31 (10)	155 ± 20 (10)
250	362 ± 12 (10)	394 ± 22 (10)	421 ± 27 (10)	444 ± 29 (10)	466 ± 33 (10)	491 ± 38 (10)	509 ± 39 (10)	510 ± 38 (10)	147 ± 28 (10)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

Table 6 Body weights of female rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of pre mating				Days of pregnancy					Days of lactation		
	1	8	15	Gain 1~15	0	7	14	20	Gain 0~20	0	4	Gain 0~4
0	228 ± 8 (10)	250 ± 12 (10)	264 ± 13 (10)	37 ± 9 (10)	274 ± 15 (9)	310 ± 18 (9)	350 ± 23 (9)	443 ± 19 (9)	168 ± 14 (9)	349 ± 26 (9)	359 ± 17 (9)	10 ± 17 (9)
8	227 ± 7 (10)	249 ± 10 (10)	261 ± 11 (10)	34 ± 9 (10)	266 ± 10 (9)	304 ± 10 (9)	346 ± 8 (9)	437 ± 15 (9)	171 ± 17 (9)	346 ± 11 (9)	359 ± 13 (9)	12 ± 5 (9)
25	226 ± 8 (10)	242 ± 11 (10)	254 ± 14 (10)	28 ± 7 (10)	265 ± 16 (10)	303 ± 17 (10)	342 ± 21 (10)	430 ± 21 (10)	165 ± 15 (10)	335 ± 21 (10)	347 ± 20 (10)	12 ± 11 (10)
80	227 ± 8 (10)	244 ± 7 (10)	259 ± 7 (10)	32 ± 9 (10)	262 ± 11 (9)	298 ± 11 (9)	338 ± 13 (9)	427 ± 14 (9)	165 ± 12 (9)	335 ± 16 (9)	353 ± 14 (9)	18 ± 11 (9)
250	227 ± 7 (10)	245 ± 8 (10)	259 ± 7 (10)	32 ± 8 (10)	267 ± 6 (9)	306 ± 11 (9)	351 ± 11 (9)	448 ± 17 (9)	181 ± 14 (9)	343 ± 9 (9)	358 ± 13 (9)	15 ± 7 (9)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

Table 7

Food consumption of male rats treated orally with
O-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose
and reproductive/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg)	Days of treatment					
	1	8	22	29	36	43
0	37 ± 3 (10)	38 ± 3 (10)	38 ± 3 (10)	38 ± 4 (10)	34 ± 3 (10)	37 ± 4 (10)
8	38 ± 4 (10)	38 ± 4 (10)	36 ± 3 (10)	37 ± 4 (10)	35 ± 3 (10)	37 ± 3 (10)
25	37 ± 5 (10)	37 ± 5 (10)	35 ± 3 (10)	37 ± 2 (10)	33 ± 2 (10)	36 ± 4 (10)
80	36 ± 4 (10)	37 ± 2 (10)	37 ± 3 (10)	38 ± 2 (10)	35 ± 3 (10)	40 ± 3 (10)
250	32 ± 4 (10)	36 ± 4 (10)	37 ± 2 (10)	38 ± 3 (10)	35 ± 3 (10)	39 ± 3 (10)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

Table 8 Food consumption of female rats treated orally with O-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	(g/rat/day)							
	Days of pre mating		Days of pregnancy				Days of lactation	
	1	8	0	7	14	20	0	3
0	25 ± 4 (10)	26 ± 4 (10)	23 ± 2 (9)	32 ± 4 (9)	31 ± 5 (9)	33 ± 4 (9)	34 ± 8 (9)	62 ± 6 (9)
8	24 ± 4 (10)	25 ± 4 (10)	21 ± 3 (9)	32 ± 4 (9)	30 ± 2 (9)	33 ± 3 (9)	37 ± 2 (9)	62 ± 6 (9)
25	22 ± 3 (10)	26 ± 2 (10)	21 ± 2 (10)	30 ± 3 (10)	28 ± 3 (10)	32 ± 3 (10)	35 ± 4 (10)	58 ± 4 (10)
80	23 ± 3 (10)	24 ± 2 (10)	21 ± 5 (9)	31 ± 4 (9)	31 ± 3 (9)	32 ± 3 (9)	35 ± 5 (9)	59 ± 5 (9)
250	24 ± 3 (10)	26 ± 3 (10)	21 ± 2 (9)	32 ± 4 (9)	31 ± 2 (9)	36 ± 4 (9)	34 ± 7 (9)	60 ± 4 (9)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

Table 9 - 1 Urinary findings of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	Color			Cloudy		Specific gravity	pH							Protein					
		PY	Y	PB	-	+		≤5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5≤	-	±	+	++	+++	++++
0	10	7	1	2	2	8	1.031 ^{a)} ± 0.011					5	5		2	7	1			
8	10	5	3	2	5	5	1.028 ± 0.007					3	7		1	7	2			
25	10	7	2	1	4	6	1.028 ± 0.012					3	7		1	1	5	3		
80	10	7	2	1	5	5	1.031 ± 0.008				1	4	5				6	4		
250	10	4	3	3	4	6	1.044* ± 0.015					3	7				7	3		

Dose (mg/kg)	No. of animals	Glucose					Ketone body					Occult blood					Urobilinogen				Bilirubin			
		-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	0.1	1	2	4	-	+	++	+++
0	10	10					3	6	1			8	2				10				10			
8	10	10					5	5				9	1				10				10			
25	10	10					5	3	2			9	1				10				10			
80	10	10					3	4	3			10					10				10			
250	10	10					7	3				10					10				10			

a) : Mean ± S.D.

Color : PY(pale yellow), Y(yellow), PB(pale brown)

Cloudy : -(negligible), +(cloudy)

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dL), +(30mg/dL), ++(100mg/dL), +++(300mg/dL), ++++(1000mg/dL)

Glucose : -(negligible), ±(0.1g/dL), +(0.25g/dL), ++(0.5g/dL), +++(1g/dL)

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dL), +(15mg/dL), ++(40mg/dL), +++(80mg/dL)

Occult blood : -(negligible), ±(trace), +(slight), ++(moderate), +++(marked)

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL

Bilirubin : -(negligible), +(slight), ++(moderate), +++(marked)

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 9 - 2 Urinary findings of male rats treated orally with o-acetoacetotoluidide
in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes				Leukocytes				Crystals													
										Mg				Ca				Ams					
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++		
0	10	9	1			9	1			1	1	5	3	10					10				
8	10	9	1			10				1	4	3	2	10					10				
25	10	10				10				3		3	4	10					10				
80	10	10				10				1	6	1	2	10					10				
250	10	10				10				1	2	5	2	10					10				

Dose (mg/kg)	No. of animals	Epithelial cells									Casts						Fat globules				
		Sq				R			S		G		H		W						
		-	+	++	+++	-	+	++	-	+	++	-	+	-	+	-	+	-	+	++	+++
0	10		8	2		10				10		10		10		10					10
8	10	1	8	1		10				10		10		10		10					10
25	10		7	3		10				10		10		10		10					10
80	10	1	9			10				10		10		10		10					10
250	10		9	1		10				10		10		10		10					10

- : Not observed; + : A few in some fields; ++ : A few in all fields; +++ : Many in all fields

Crystals	Epithelial cells	Casts
Mg(ammonium magnesium phosphate)	Sq(squamous)	G(granule)
Ca(calcium phosphate)	R(round)	H(hyaline)
Ams(amorphous)	S(spindle)	W(waxy)

Table 10

Hematological findings of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide
in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	Met-Hb (%)	Hein-B (%)
0	10	810 ± 36	14.8 ± 0.5	44.5 ± 1.2	55 ± 2	18.3 ± 0.7	33.3 ± 0.5	35 ± 8	0.8 ± 0.5	0 ± 0
8	10	804 ± 32	14.8 ± 0.6	44.3 ± 1.8	55 ± 1	18.4 ± 0.4	33.4 ± 0.5	41 ± 7	0.6 ± 0.5	0 ± 0
25	10	779 ± 22	14.5 ± 0.5	43.3 ± 1.3	56 ± 1	18.6 ± 0.5	33.5 ± 0.5	46 ± 12	0.5 ± 0.7	0 ± 0
80	10	756** ± 42	14.3 ± 0.7	43.0 ± 2.0	57* ± 1	18.9 ± 0.3	33.2 ± 0.3	50 ± 13	0.8 ± 0.6	0 ± 0
250	10	681** ± 28	13.3** ± 0.4	40.1** ± 1.0	59** ± 2	19.5** ± 0.7	33.1 ± 0.5	94** ± 20	1.3 ± 0.7	27** ± 25

Dose (mg/kg)	No. of animals	Plat. ($10^4/\mu\text{L}$)	PT (sec)	APTT (sec)	WBC ($10^2/\mu\text{L}$)
0	10	136 ± 16	12.9 ± 0.5	17.6 ± 1.1	79 ± 14
8	10	140 ± 15	13.5 ± 1.1	18.4 ± 1.6	72 ± 14
25	10	137 ± 14	13.0 ± 0.4	18.1 ± 1.3	81 ± 26
80	10	132 ± 15	13.2 ± 0.3	17.7 ± 1.3	74 ± 21
250	10	148 ± 13	13.2 ± 0.7	18.5 ± 1.5	77 ± 20

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 11 Blood biochemical findings of male rats treated orally with o-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	LDH (IU/L)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	ChE (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Cho. (mg/dL)
0	10	280 $\pm$ 114	61 $\pm$ 6	34 $\pm$ 6	245 $\pm$ 61	0.71 $\pm$ 0.54	53 $\pm$ 15	6.21 $\pm$ 0.25	2.81 $\pm$ 0.21	0.83 $\pm$ 0.11	68 $\pm$ 14
8	10	262 $\pm$ 85	66 $\pm$ 7	36 $\pm$ 6	226 $\pm$ 42	1.14 $\pm$ 0.50	41 $\pm$ 12	6.26 $\pm$ 0.18	2.88 $\pm$ 0.31	0.87 $\pm$ 0.14	67 $\pm$ 15
25	10	304 $\pm$ 97	66 $\pm$ 9	38 $\pm$ 6	228 $\pm$ 44	0.67 $\pm$ 0.56	49 $\pm$ 12	6.42 $\pm$ 0.12	2.98 $\pm$ 0.18	0.87 $\pm$ 0.09	84 $\pm$ 13
80	10	302 $\pm$ 141	65 $\pm$ 7	37 $\pm$ 8	243 $\pm$ 68	0.48 $\pm$ 0.33	44 $\pm$ 19	6.26 $\pm$ 0.15	2.74 $\pm$ 0.28	0.78 $\pm$ 0.13	76 $\pm$ 17
250	10	302 $\pm$ 78	62 $\pm$ 5	38 $\pm$ 7	225 $\pm$ 55	0.91 $\pm$ 0.65	54 $\pm$ 27	6.12 $\pm$ 0.27	2.60 $\pm$ 0.37	0.74 $\pm$ 0.15	74 $\pm$ 17
Dose (mg/kg)	No. of animals	T.G. (mg/dL)	Glu. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0	10	83 $\pm$ 27	137 $\pm$ 19	0.27 $\pm$ 0.03	15.4 $\pm$ 1.4	0.51 $\pm$ 0.05	10.3 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.8	142 $\pm$ 1	4.69 $\pm$ 0.28	103 $\pm$ 1
8	10	81 $\pm$ 15	136 $\pm$ 27	0.28 $\pm$ 0.02	15.7 $\pm$ 1.6	0.54 $\pm$ 0.07	10.5 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.4	142 $\pm$ 1	4.76 $\pm$ 0.18	103 $\pm$ 1
25	10	83 $\pm$ 30	135 $\pm$ 23	0.29 $\pm$ 0.02	15.6 $\pm$ 1.9	0.51 $\pm$ 0.03	10.5 $\pm$ 0.3	7.0 $\pm$ 0.6	143 $\pm$ 1	4.92 $\pm$ 0.31	104 $\pm$ 1
80	10	91 $\pm$ 34	133 $\pm$ 27	0.31* $\pm$ 0.02	16.2 $\pm$ 2.2	0.51 $\pm$ 0.07	10.5 $\pm$ 0.2	7.2 $\pm$ 0.5	143 $\pm$ 1	4.97 $\pm$ 0.29	103 $\pm$ 2
250	10	94 $\pm$ 36	124 $\pm$ 17	0.33** $\pm$ 0.03	17.3 $\pm$ 1.1	0.54 $\pm$ 0.04	10.5 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.6	142 $\pm$ 1	5.47** $\pm$ 0.40	104 $\pm$ 1

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 12 Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Grade	Dose(mg/kg) 0			8			25		80			250		
		Fate	TK	FP (T)	TK	FP	(T)	TK	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)
		No. of animals	9	1 (10)	9	1 (10)	10 (10)	9	1 (10)	9	1 (10)	9	1 (10)		
Liver : Granular, yellow caudate lobe	-		9	1 (10)	8	1 (9)	10 (10)	9	1 (10)	9	1 (10)				
	+		0	0 (0)	1	0 (1)	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)				
Testis : Atrophy	-		9	1 (10)	9	0 (9)	10 (10)	9	1 (10)	9	1 (10)				
	+		0	0 (0)	0	1 (1)	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)				
Adrenal: Enlargement	-		9	1 (10)	9	1 (10)	10 (10)	8	1 (9)	9	1 (10)				
	+		0	0 (0)	0	0 (0)	0 (0)	1	0 (1)	0	0 (0)				
Spleen : Black	-		9	1 (10)	9	1 (10)	10 (10)	7	1 (8)	1	0 (1)				
	+		0	0 (0)	0	0 (0)	0 (0)	2	0 (2)	8	1 (9)**				
Enlargement	-		9	1 (10)	9	1 (10)	10 (10)	9	1 (10)	8	1 (9)				
	+		0	0 (0)	0	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	1	0 (1)				

- : Negative; + : Slight; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; T : Total
Significantly different from control group (** : $p < 0.01$)

Table 13 Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Grade	Dose (mg/kg) 0			8			25		80			250			
		Fate	TK	NP	(T)	TK	NP	(T)	TK	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	(T)
		No. of animals	9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
Lung : Red spot	-		9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	8	1	(9)
	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(1)
Uterus : Hydrometra	-		9	0	(9)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
	+		0	1	(1)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
Adrenal: Red	-		9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	8	1	(9)	9	1	(10)
	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	1	0	(1)	0	0	(0)
Spleen : Black	-		9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	2	0	(2)	0	0	(0)
	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	7	1	(8)	7	0	(7)
	++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	2	1	(3)
Enlargement	-		9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	3	1	(4)
	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	6	0	(6)
Adhesion, peritoneum	-		8	1	(9)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
	+		1	0	(1)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant, killed at the termination;
T : Total; Significantly different from control group (** : p<0.01)

Table 14

Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with o-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Thyr. (mg)	Pitui. (mg)	Adrenal (mg)	Testis (g)	Epidid. (g)
Absolute	0	10	486 ± 30	2.07 ± 0.10	13.29 ± 1.58	3.14 ± 0.21	0.83 ± 0.11	1.38 ± 0.13	0.33 ± 0.06	33.7 ± 2.9	13.6 ± 1.4	66.8 ± 12.2	3.49 ± 0.23	1.53 ± 0.14
	8	10	472 ± 29	2.10 ± 0.05	12.63 ± 1.46	3.03 ± 0.11	0.84 ± 0.09	1.34 ± 0.12	0.32 ± 0.07	32.7 ± 3.8	13.4 ± 0.8	63.5 ± 10.2	3.10 ± 0.64	1.41 ± 0.21
	25	10	475 ± 32	2.10 ± 0.09	13.28 ± 1.14	3.11 ± 0.22	0.87 ± 0.09	1.37 ± 0.07	0.32 ± 0.08	34.9 ± 2.8	14.6 ± 1.6	61.6 ± 4.0	3.55 ± 0.25	1.46 ± 0.09
	80	10	482 ± 30	2.13 ± 0.11	13.93 ± 1.59	3.21 ± 0.35	0.94 ± 0.18	1.42 ± 0.11	0.36 ± 0.07	36.0 ± 5.2	14.2 ± 1.0	61.8 ± 16.1	3.44 ± 0.27	1.49 ± 0.18
	250	10	475 ± 37	2.11 ± 0.05	13.80 ± 1.58	2.99 ± 0.17	1.11** ± 0.14	1.33 ± 0.10	0.29 ± 0.05	35.2 ± 3.9	15.4* ± 1.6	55.7 ± 7.9	3.42 ± 0.18	1.43 ± 0.14
Relative@	0	10	486 ± 30	0.43 ± 0.03	2.73 ± 0.22	0.65 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.07 ± 0.01	7.0 ± 0.6	2.8 ± 0.3	13.7 ± 2.1	0.72 ± 0.05	0.32 ± 0.03
	8	10	472 ± 29	0.45 ± 0.02	2.67 ± 0.17	0.64 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.07 ± 0.01	6.9 ± 0.6	2.8 ± 0.3	13.5 ± 2.6	0.66 ± 0.14	0.30 ± 0.04
	25	10	475 ± 32	0.44 ± 0.04	2.79 ± 0.13	0.66 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.07 ± 0.01	7.4 ± 0.9	3.1 ± 0.4	13.0 ± 0.8	0.75 ± 0.07	0.31 ± 0.02
	80	10	482 ± 30	0.44 ± 0.03	2.89 ± 0.23	0.67 ± 0.05	0.19 ± 0.03	0.29 ± 0.01	0.07 ± 0.01	7.5 ± 1.1	3.0 ± 0.3	12.8 ± 3.2	0.71 ± 0.04	0.31 ± 0.04
	250	10	475 ± 37	0.45 ± 0.03	2.90 ± 0.18	0.63 ± 0.04	0.23** ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.06 ± 0.01	7.5 ± 1.1	3.3* ± 0.4	11.8 ± 2.0	0.72 ± 0.06	0.30 ± 0.03

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 15

Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with
o-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and
reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Thyr. (mg)	Pitui. (mg)	Adrenal (mg)
Absolute	0	9	359 ± 17	1.98 ± 0.06	14.80 ± 0.74	2.10 ± 0.15	0.71 ± 0.16	1.07 ± 0.09	0.27 ± 0.03	23.4 ± 3.9	18.1 ± 2.5	81.7 ± 14.0
	8	9	359 ± 13	1.99 ± 0.11	14.35 ± 0.89	2.18 ± 0.19	0.67 ± 0.10	1.02 ± 0.07	0.27 ± 0.10	22.0 ± 3.2	16.0 ± 1.6	72.2 ± 8.5
	25	10	347 ± 20	1.95 ± 0.09	14.61 ± 0.91	2.04 ± 0.14	0.74 ± 0.11	1.04 ± 0.08	0.25 ± 0.09	22.4 ± 3.1	14.4** ± 1.1	75.0 ± 12.0
	80	9	353 ± 14	1.99 ± 0.07	14.81 ± 1.14	2.11 ± 0.17	0.77 ± 0.10	1.05 ± 0.04	0.23 ± 0.03	24.2 ± 3.0	17.1 ± 1.5	76.1 ± 8.9
	250	9	358 ± 13	1.98 ± 0.08	16.10 ± 1.16	2.16 ± 0.14	1.12** ± 0.19	1.10 ± 0.08	0.25 ± 0.05	26.8 ± 2.8	17.5 ± 2.1	72.6 ± 4.1
Relative@	0	9	359 ± 17	0.55 ± 0.03	4.12 ± 0.26	0.58 ± 0.03	0.20 ± 0.05	0.30 ± 0.02	0.07 ± 0.01	6.5 ± 1.1	5.0 ± 0.7	22.7 ± 3.9
	8	9	359 ± 13	0.55 ± 0.02	4.00 ± 0.18	0.61 ± 0.06	0.18 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.07 ± 0.03	6.1 ± 0.9	4.5 ± 0.4	20.1 ± 2.4
	25	10	347 ± 20	0.56 ± 0.04	4.21 ± 0.21	0.59 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.07 ± 0.02	6.5 ± 0.8	4.1* ± 0.3	21.7 ± 3.8
	80	9	353 ± 14	0.56 ± 0.02	4.19 ± 0.31	0.60 ± 0.05	0.22 ± 0.03	0.30 ± 0.01	0.07 ± 0.01	6.9 ± 0.9	4.8 ± 0.4	21.5 ± 2.7
	250	9	358 ± 13	0.55 ± 0.03	4.50* ± 0.23	0.61 ± 0.04	0.31** ± 0.05	0.31 ± 0.02	0.07 ± 0.01	7.5 ± 0.6	4.9 ± 0.6	20.3 ± 1.3

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 16-1 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with *o*-acetoacetotolidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Grade	Dose(mg/kg) 0			8			25		80			250			
		Fate	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)	TK	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)
		No. of animals	9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
Heart : Myocardial degeneration /fibrosis	-		7	1	(8)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	6	1	(7)
	+		2	0	(2)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	3	0	(3)
Cellular infiltration, lymphocyte, focal	-		8	1	(9)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	9	1	(10)
	+		1	0	(1)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	0	0	(0)
Lung : Mineralization, artery	-		5	1	(6)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	7	0	(7)
	+		4	0	(4)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	2	1	(3)
Accumulation, foam cell	-		7	1	(8)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	8	1	(9)
	+		2	0	(2)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	1	0	(1)
Hemorrhage/cellular infiltration, neutrophil, focal	-		8	1	(9)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	8	1	(9)
	+		1	0	(1)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	1	0	(1)
Liver : Degeneration, fatty, hepatocyte, periportal	-		8	1	(9)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
	+		1	0	(1)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
Necrosis, focal	-		9	1	(10)	8	1	(9)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
	++		0	0	(0)	1	0	(1)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
Microgranuloma	-		7	0	(7)	8	0	(8)	9	(9)	7	1	(8)	7	1	(8)
	+		2	1	(3)	1	1	(2)	1	(1)	2	0	(2)	2	0	(2)
Deposit, hemosiderin, Kupffer cell	-		9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	5	1	(6)	0	0	(0)
	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	4	0	(4)*	9	1	(10)**

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; - : Not examined; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; T : Total; Significantly different from control group (* : p<0.05; ** : p<0.01)

Table 16-2 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with *o*-acetoacetotolidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Grade	Dose(mg/kg) 0			8			25		80			250												
		Fate	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)	TK	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)									
		No. of animals	9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)									
Kidney : Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	-		8	1	(9)		6	1	(7)		10	(10)		6	1	(7)		2	0	(2)					
	+		1	0	(1)	}	(1)		1	0	(1)	}	(3)		0	0	(0)	}	(3)		4	1	(5)		
	++		0	0	(0)			2	0	(2)			0	0	(0)		0		0	(0)		3	0	(3)	(8)**
Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	-		0	0	(0)	}	(10)		0	0	(0)	}	(9)		0	0	(0)	}	(10)		0	0	(0)	}	(10)
	+		9	1	(10)			9	1	(10)			9	(9)		9	1		(10)		9	1	(10)		
	++		0	0	(0)		0	0	(0)		1	(1)		0	0	(0)		0	0	(0)					
Cyst, solitary/multiple	-		9	1	(10)		7	1	(8)		10	(10)		8	0	(8)		9	1	(10)					
	+		0	0	(0)		2	0	(2)		0	(0)		1	1	(2)		0	0	(0)					
Cast, hyaline/proteinous	-		7	1	(8)		9	1	(10)		10	(10)		9	1	(10)		9	1	(10)					
	+		2	0	(2)		0	0	(0)		0	(0)		0	0	(0)		0	0	(0)					
Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-		8	1	(9)		9	1	(10)		8	(8)		9	0	(9)		8	1	(9)					
	+		1	0	(1)		0	0	(0)		2	(2)		0	1	(1)		1	0	(1)					
Basophilic tubules	-		6	1	(7)		5	1	(6)		7	(7)		8	0	(8)		8	1	(9)					
	+		3	0	(3)		4	0	(4)		3	(3)		1	1	(2)		1	0	(1)					
Urinary : Cellular infiltration, bladder lymphocyte, submucosa	-		8	1	(9)		-	-			-	-		-	-			9	1	(10)					
	+		1	0	(1)		-	-			-	-		-	-			0	0	(0)					

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; - : Not examined; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; T : Total; Significantly different from control group (** : p<0.01)

Table 16-3 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with *o*-acetoacetotolidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Grade	Dose (mg/kg) 0			8			25		80			250			
		Fate	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)	TK	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)
		No. of animals	9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
Testis : Atrophy, seminiferus tubule	-		9	1	(10)	-	0		-		-	1		9	1	(10)
	++		0	0	(0)	-	1		-		-	0		0	0	(0)
Hyperplasia, interstitial cell	-		9	1	(10)	-	0		-		-	1		9	1	(10)
	+		0	0	(0)	-	1		-		-	0		0	0	(0)
Epididymis: Decrease, sperm	-		9	1	(10)	-	0		-		-	1		9	1	(10)
	+++		0	0	(0)	-	1		-		-	0		0	0	(0)
Cell debris, lumen	-		9	1	(10)	-	0		-		-	1		9	1	(10)
	++		0	0	(0)	-	1		-		-	0		0	0	(0)
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	-		7	1	(8)	-	1		-		-	1		9	1	(10)
	+		2	0	(2)	-	0		-		-	0		0	0	(0)
Prostate: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	-		-	0		-	1		-		-	1		-	1	
	+		-	1		-	0		-		-	0		-	0	
Thymus : Hemorrhage	-		8	1	(9)	-	1		-		-	1		9	1	(10)
	+		1	0	(1)	-	0		-		-	0		0	0	(0)
Pituitary : Cyst, anterior lobe	-		9	1	(10)	-	1		-		-	1		8	1	(9)
	+		0	0	(0)	-	0		-		-	0		1	0	(1)

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; +++ : Severe; - : Not examined; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; T : Total

Table 16-4 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with *o*-acetoacetotolidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Grade	Dose(mg/kg) 0				8			25		80			250		
		Fate	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)	TK	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)
		No. of animals	9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
Spleen : Hematopoiesis, extramedullary	-		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
	+		8	1	(9)	8	1	(9)	8	(8)	7	1	(8)	0	0	(0)
	++		1	0	(1)	1	0	(1)	2	(2)	2	0	(2)	9	1	(10)**
Deposit, hemosiderin	-		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
	+		8	1	(9)	7	1	(8)	10	(10)	3	1	(4)	0	0	(0)
	++		1	0	(1)	2	0	(2)	0	(0)	6	0	(6)*	9	1	(10)**
Congestion	-		9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	6	1	(7)	0	0	(0)
	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	3	0	(3)	6	1	(7)
	++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	3	0	(3)

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; T : Total
Significantly different from control group (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$)

No abnormalities were detected in the stomach, thyroid, adrenal, bone marrow, brain, spinal cord and sciatic nerve from animals of control and 250 mg/kg groups, and FP animals, and in the seminal vesicle from FP animals, and in the adrenal with a macroscopical abnormality from No. 039 animal of 80 mg/kg group.

Table 17-1 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with *o*-acetoacetotolidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Grade	Dose(mg/kg) 0			8			25		80			250			
		Fate	TK	NP	(T)	TK	NP	(T)	TK	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	(T)
		No. of animals	9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
Heart : Myocardial degeneration /fibrosis	-		9	1	(10)	-	0		-		-	1		9	1	(10)
	+		0	0	(0)	-	1		-		-	0		0	0	(0)
Cellular infiltration, lymphocyte, focal	-		9	0	(9)	-	1		-		-	1		9	1	(10)
	+		0	1	(1)	-	0		-		-	0		0	0	(0)
Lung : Mineralization, artery	-		7	0	(7)	-	0		-		-	1		9	1	(10)
	+		2	1	(3)	-	1		-		-	0		0	0	(0)
Accumulation, foam cell	-		9	1	(10)	-	1		-		-	1		7	1	(8)
	+		0	0	(0)	-	0		-		-	0		2	0	(2)
Hemorrhage/proliferation, macrophage, focal	-		9	1	(10)	-	1		-		-	1		8	1	(9)
	+		0	0	(0)	-	0		-		-	0		1	0	(1)
Liver : Necrosis, focal	-		9	1	(10)	8	1	(9)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
	+		0	0	(0)	1	0	(1)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
Deposit, hemosiderin, Kupffer cell	-		9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	5	1	(6)	0	0	(0)
	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	4	0	(4)*	9	1	(10)**
Kidney: Cyst, solitary	-		8	1	(9)	-	1		-		-	1		8	1	(9)
	+		1	0	(1)	-	0		-		-	0		1	0	(1)
Mineralization, cortico- medullary junction	-		9	0	(9)	-	0		-		-	0		9	1	(10)
	+		0	1	(1)	-	1		-		-	1		0	0	(0)
Urinary:Cellular infiltration, bladder lymphocyte, submucosa	-		8	1	(9)	-	1		-		-	1		9	1	(10)
	+		1	0	(1)	-	0		-		-	0		0	0	(0)

- : Negative; + : Slight; - : Not examined; TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant, killed at the termination; T : Total
Significantly different from control group (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$)

Table 17-2 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with *o*-acetoacetotolidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

		Dose(mg/kg) 0			8			25		80			250				
Organs	Findings	Grade	Fate No. of animals	TK 9	NP 1	(T) (10)	TK 9	NP 1	(T) (10)	TK 10	(T) (10)	TK 9	NP 1	(T) (10)	TK 9	NP 1	(T) (10)
Uterus	Dilatation, lumen	-		-	0		-	1		-		-	1		-	1	
		+		-	1		-	0		-		-	0		-	0	
Thymus	Hemorrhage	-		8	1	(9)	-	1		-		-	1		9	1	(10)
		+		1	0	(1)	-	0		-		-	0		0	0	(0)
Spleen	Hematopoiesis, extramedullary	-		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
		+		8	1	(9)	7	1	(8)	9	(9)	5	1	(6)	0	0	(0)
		++		1	0	(1)	2	0	(2)	1	(1)	4	0	(4)	8	1	(9)
		+++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(1)
	Deposit, hemosiderin	-		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
		+		8	1	(9)	8	1	(9)	8	(8)	2	0	(2)	0	0	(0)
		++		1	0	(1)	1	0	(1)	2	(2)	7	1	(8)	9	0	(9)
		+++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	1	(1)
	Congestion	-		9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	6	0	(6)	0	0	(0)
		+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	3	1	(4)	0	0	(0)
		++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	8	0	(8)
		+++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	1	1	(2)
	Adhesive inflammation	-		8	1	(9)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
		++		1	0	(1)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; +++ : Severe; - : Not examined; TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant, killed at the termination; T : Total; Significantly different from control group (* : p<0.05; ** : p<0.01)

No abnormalities were detected in the stomach, pituitary, thyroid, adrenal, bone marrow, brain, spinal cord and sciatic nerve from control and 250 mg/kg groups, and NP animals, and in the ovary from NP animals, and in the adrenal with a macroscopic abnormality from No.538 animal of 80 mg/kg group.

Table 18 Reproduction results of treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	8	25	80	250
No. of pairs mated	10	10	10	10	10
No. of pairs with successful copulation	10	10	10	10	10
Copulation index (%)	100	100	100	100	100
Pairing days until copulation(days, Mean±S.D.)	2.3 ± 1.16	2.4 ± 1.26	2.9 ± 0.88	2.3 ± 0.82	2.3 ± 1.06
No. of pregnant females	9	9	10	9	9
Fertility index (%)	90	90	100	90	90
No. of corpora lutea (Mean±S.D.)	21.8 ± 2.0	21.7 ± 2.1	20.9 ± 2.2	20.7 ± 1.2	21.2 ± 2.5
No. of implantation sites (Mean±S.D.)	17.2 ± 1.9	15.9 ± 1.8	16.0 ± 3.2	16.1 ± 0.9	18.0 ± 0.9
Implantation index (% , Mean±S.D.)	79.5 ± 9.5	73.7 ± 9.2	77.1 ± 16.2	78.4 ± 8.3	85.7 ± 8.8
No. of pregnant females with parturition	9	9	10	9	9
Gestation length (days, Mean±S.D.)	22.7 ± 0.5	23.0 ± 0	22.7 ± 0.5	22.7 ± 0.5	22.4 ± 0.5
No. of pregnant females with live pups	9	9	10	9	9
Gestation index (%)	100	100	100	100	100
No. of pregnant females with live pups on day 4	9	9	10	9	9

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated) × 100

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation) × 100

Gestation index = (No. of females with live pups/No. of living pregnant females) × 100

Table 19

Litter results of female rats treated orally with
O-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose
and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	8	25	80	250
No. of pups born	16.2± 1.7	15.2± 1.3	15.3± 3.4	15.2± 1.9	16.7± 1.7
Delivery index (%)	94.5± 7.4	96.2± 5.0	95.6± 6.6	94.2± 8.5	92.5± 7.2
No. of pups alive on day 0 of lactation					
Total	15.8± 1.5	14.9± 1.2	15.0± 3.3	14.7± 2.1	16.2± 1.7
Male	7.7± 2.1	8.6± 1.7	7.6± 3.3	6.8± 1.6	9.0± 1.4
Female	8.1± 2.1	6.3± 1.5	7.4± 2.2	7.9± 2.7	7.2± 2.0
Live birth index (%)	97.5± 5.5	97.9± 3.2	98.2± 4.2	96.2± 4.8	97.4± 4.4
Sex ratio (Male/Female)	0.92	1.36	0.99	0.88	1.24
No. of pups alive on day 4 of lactation					
Total	15.6± 1.6	14.9± 1.2	14.9± 3.2	14.6± 2.1	15.8± 1.6
Male	7.4± 1.8	8.6± 1.7	7.6± 3.3	6.8± 1.6	8.9± 1.5
Female	8.1± 2.1	6.3± 1.5	7.3± 2.3	7.8± 2.7	6.9± 1.9
Viability index (%)	98.6± 2.8	100 ± 0	99.5± 1.6	99.3± 2.1	97.4± 3.1
Body weight of live pups (g)					
on day 0					
Male	7.4± 0.7	7.8± 0.4	7.7± 0.9	7.5± 0.5	7.0± 0.4
Female	6.9± 0.7	7.4± 0.3	7.1± 0.9	7.2± 0.6	6.6± 0.4
on day 4					
Male	12.0± 1.1	13.0± 0.9	12.6± 2.3	12.4± 1.3	11.1± 0.5
Female	11.3± 1.2	12.5± 0.7	11.7± 2.0	12.1± 1.5	10.6± 0.5

Delivery index = (No. of pups born / No. of implantation sites)×100

Live birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of pups born)×100

Viability index = (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0)×100

Sex ratio = Total No. of male pups / Total No. of female pups

Each value is expressed as Mean ± S.D., except sex ratio .

Table 20

Incidence of external findings of rats treated orally
with O-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose
and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	8	25	80	250
External	No. of pups examined	146	137	153	137	150
	No. of pups with external anomalies	0	0	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

(): No. of pups (Mean $\pm$ S.D. of individual litter percentages)

Table 21 - 1 Incidence of visceral findings of rats treated orally
with *O*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose
and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	8	25	80	250
Visceral	No. of pups examined	146	137	153	135	149
	No. of pups with visceral anomalies	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

(): No. of pups (Mean $\pm$ S.D. of individual litter percentages)

Table 21 - 2 Incidence of visceral findings of rats treated orally
with *O*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose
and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	8	25	80	250
Visceral	No. of pups examined	146	137	153	135	149
	No. of pups with visceral variations					
		7 (4.7±5.2)	8 (6.0±9.3)	5 (3.2±5.4)	5 (4.4±10.3)	7 (4.8±5.6)
	Visceral variations					
	Thymic remnant in neck	5 (3.6±5.0)	5 (3.8±7.2)	4 (2.5±4.1)	4 (3.4±10.3)	6 (4.1±4.2)
	Persistent left umbilical artery	2 (1.2±3.5)	3 (2.2±4.7)	1 (0.7±2.2)	1 (1.0±3.0)	1 (0.6±1.9)

(): No. of pups (Mean ± S.D. of individual litter percentages)