
1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンのラットを用いる
経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

最 終 報 告 書

作成日 2000年8月29日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目次

要約	12
緒言	14
方法	
1.被験物質および媒体	14
2.投与検体および濃度確認	14
3.使用動物および飼育条件	15
4.投与経路, 投与方法, 群構成, 投与量および投与期間	16
5.観察および検査項目	17
6.統計学的方法	21
結果	
I. 反復投与毒性	22
1. 雄(P)に及ぼす影響	22
2. 雌(P)に及ぼす影響	24
II. 生殖発生毒性	26
1. 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響	26
2. 新生児(F ₁)に及ぼす影響	27
考察	28
文献	29

Attachment, Table, Fig.およびAppendixの目次

Table 1-1	General signs of male rats (P) in combined repeat dose ~ 1-5 and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 33~ 37
Table 2	Body weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 38
Table 3	Food consumption of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 39
Table 4-1	Urinary examination of male rats (P) in combined repeat dose ~ 4-2 and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 40~ 41
Table 5	Hematological examination of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 42
Table 6	Blood chemical examination of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 43
Table 7	Necropsy findings of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 44
Table 8	Organ weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 45

Table 9	Histopathological findings of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 46
Table 10-1 ~10-2	General signs of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 47~ 48
Table 11-1 ~11-2	General signs of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 49~ 50
Table 12	General signs of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 51
Table 13	Body weight of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 52
Table 14	Body weight of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 53
Table 15	Body weight of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 54
Table 16	Food consumption of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 55
Table 17	Food consumption of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	 56

Table 18	Food consumption of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	57
Table 19-1	Necropsy findings of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	58
Table 19-2	Necropsy findings of dead female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	59
Table 20	Organ weight of dams (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	60
Table 21	Histopathological findings of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	61
Table 22	Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	62
Table 23	Observation of pups (F1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	63
Table 24	Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	64
Table 25	Necropsy findings of pups (F1) on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	65

Fig. 1	Chemical structure of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-	66
Fig. 2	Body weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	67
Fig. 3	Food consumption of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	68
Fig. 4	Body weight of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	69
Fig. 5	Body weight of dams (P) during pregnancy and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	70
Fig. 6	Food consumption of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	71
Fig. 7	Food consumption of dams (P) during pregnancy and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	72
Fig. 8	Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration	73

要約

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い，雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに，性腺機能，交尾行動，受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した．投与量は，20 mg/kgを最高用量とし，以下公比2により10，5および2.5 mg/kgとした．対照として媒体（コーンオイル）投与群を設けた．なお，各群の使用動物数は雌雄各12例とした．

I. 反復投与毒性

1. 雄(P)に及ぼす影響

一般状態：いずれの群とも死亡および瀕死例は認められなかった．20 mg/kg群で被毛の汚れがみられた．

体重：20 mg/kg群で低値傾向がみられた．

摂餌量：10および20 mg/kg群で一過性の低値がみられた．

尿検査：投与に起因する変化はみられなかった．

血液学検査：20 mg/kg群でPTおよびAPTTの低値傾向あるいは低値がみられた．

血液生化学検査：20 mg/kg群で総蛋白およびアルブミン量の低値がみられた．

剖検：5 mg/kg群で前胃粘膜の潰瘍および浮腫が1例，10 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚が1例，20 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚が11例と潰瘍が9例みられた．

器官重量：20 mg/kg群で脾臓の絶対および相対重量の高値傾向あるいは高値がみられた．

病理組織学検査：胃において5 mg/kg群で前胃角化亢進および前胃上皮過形成が各2例，前胃粘膜への炎症細胞浸潤が3例みられた．10 mg/kg群では，前胃角化亢進，前胃上皮過形成および前胃粘膜への炎症細胞浸潤が各9例みられた．20 mg/kg群では，前胃角化亢進，前胃上皮過形成および前胃粘膜への炎症細胞浸潤が各12例，腺胃粘膜への炎症細胞浸潤および前胃のびらんが各2例みられた．

2. 雌(P)に及ぼす影響

一般状態：20 mg/kg群で3例が死亡した．一般状態において，投与に起因する変化はみられなかった．

体重：20 mg/kg群では，妊娠期に一過性の低値がみられた．

摂餌量：20 mg/kg群では，妊娠期に一過性の低値がみられた．

剖検：10 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚および潰瘍が各1例，20 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚が4例と潰瘍が3例みられた．

器官重量：投与に起因する変化はみられなかった．

病理組織学検査：生存例では，胃において対照群で前胃潰瘍が1例みられた．2.5 mg/kg群では，前胃角化亢進および前胃上皮過形成が各5例，前胃粘膜への炎症細胞浸潤が1例みられた．5 mg/kg群では，前胃角化亢進および前胃上皮過形成が各4例，前胃粘膜への炎症

細胞浸潤が3例，前胃潰瘍が1例みられた．10 mg/kg群では，前胃角化亢進および前胃上皮過形成が各10例，前胃粘膜への炎症細胞浸潤が9例みられた．20 mg/kg群では，前胃角化亢進および前胃上皮過形成が各9例，前胃粘膜への炎症細胞浸潤が8例，前胃潰瘍が3例みられた．

20 mg/kg群の死亡例では，各組織に死後変化が認められたため，組織学所見は得られなかった．

II．生殖発生毒性

1. 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

病理組織学検査：精巣，精巣上体，精囊，前立腺，卵巣，子宮，膣および乳腺に投与に起因する変化はみられなかった．

発情回数，交尾率，交尾所要日数：投与に起因する変化はみられなかった．

受胎雌数，妊娠期間，分娩状態，哺育状態：投与に起因する変化はみられなかった．

受胎率：投与に起因する変化はみられなかった．

妊娠黄体数，着床数，着床率：投与に起因する変化はみられなかった．

出産率：投与に起因する変化はみられなかった．

2. 新生児(F₁)に及ぼす影響

総出産児数，死産児数，哺育0日の新生児数，哺育0日の性比，分娩率，児の産出率，出生率：投与に起因する変化はみられなかった．

一般状態：投与に起因する変化はみられなかった．

哺育4日の生存児数，哺育4日の性比，哺育4日の生存率：投与に起因する変化はみられなかった．

外表観察：投与に起因する変化はみられなかった．

体重：投与に起因する変化はみられなかった．

剖検：投与に起因する変化はみられなかった．

以上のように，1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの一般毒性学的無影響量は，雄では5 mg/kg投与により胃に影響が認められたことから2.5 mg/kg/day，雌では2.5 mg/kg投与により胃に影響が認められたことから2.5 mg/kg/day未満と考えられる．また，生殖発生毒性学的な無影響量は，雌雄とも20 mg/kg投与してもいずれの観察項目にも影響は認められなかったことから20 mg/kg/dayと考えられる．

緒言

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンが継続的に人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Testに従って1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンを雄ラットに1日1回、49日間および雌ラットに1日1回、40～51日間経口投与した反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質の1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン(CAS No.941-69-5)は、Fig.1に示す化学構造を有し、分子量：173.17，融点：88.7℃，沸点：142℃/0.8 kPaであり，水(100 ppm以下)，アセトン(約50 g/100 mL)，DMSO(約50 g/100 mL)に溶解する黄色フレーク状の物質である。当試験には，1998年9月21日に厚生省生活衛生局企画課 生活化学安全対策室から提供されたものを用いた[製造元： Lot No. 純度：99.2 wt%，ただし，不純物として，2-アニリノN-フェニルサクシニミド0.5～0.8%，1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンのポリマー0.03%を含む]。入手後は，試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温・遮光・気密条件下で保管した。なお，投与期間終了後に試験施設での保管分を除いた残余被験物質は に返却し，その一部について分析した結果，純度は99.2%であり，使用期間中の安定性が確認された。

媒体として，コーンオイルを用いた。コーンオイル(片山化学工業株式会社，Lot No. A5932，入手日：1999年5月18日，使用期限：2004年5月17日)は，入手後，試験施設の被験物質保管室に室温条件下で保管した。

2. 投与検体および濃度確認

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンは，各濃度ごとにコーンオイルで懸濁して調製した。なお，0.5および50 mg/mLの調製液は，室温・遮光条件下で7日間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため¹⁾(Attachment 1)，各濃度の調製液は調製後，1日分ごとに小分けし，室温・遮光条件下で保管し，調製後7日以内に使用した。投与後の残余投与検体は廃棄した。なお，調製に際して，被験物質の純度による換算は実施しなかった。

投与開始日に使用した各投与検体中の被験物質濃度を試験施設内で高速液体クロマトグラフを用いて測定した。その結果，被験物質濃度は表示濃度の98.6～109.9%であり，濃度に問題はなかった(Attachment 2)。

3. 使用動物および飼育条件

1) 動物種および系統

試験には、毒性試験に汎用されているSprague-Dawley系雌雄ラット [(SPF), Crj: CD (SD)IGS] を用いた。動物は、1999年5月19日に日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から8週齢で雌雄各73匹を購入した。入手後1日の体重範囲は、雄が241~272 g, 雌が198~234 gであった。

2) 検疫および馴化, 群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後7日間の馴化期間を設けた。この間に、3回の体重測定および毎日一般状態の観察を、さらに雌は馴化期間中に7日間の性周期観察を行った。一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けして試験に用いた。

群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日に行った。群分け後の残余動物のうち、検疫・馴化動物番号の若い順に雄2例を選び、飼育期間終了時に微生物モニタリング検査に用いた。その他の残余雄および残余雌は、投与開始日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に廃棄処分した。

動物の個体識別は、検疫・馴化期間中は入手日に油性インクによる記入法および色素塗布法を、群分け後は色素塗布法および耳パンチ法を併用して行った。さらに、検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号、入手年月日、性別および検疫・馴化動物番号を記入したラベルを、群分け後の各ケージには試験番号、投与量、性別、動物番号および交尾成立日(雌のみ)を記入し、群ごとに色分けしたラベルを取り付けた。

3) 環境条件および飼育管理

動物は、室温20~26 °C(実測値: 20~25 °C), 湿度40~70 %(実測値: 47~70 %), 明暗各12時間(照明: 午前6時~午後6時), 換気回数12回/時(フィルターにより除菌した新鮮空気)に維持されている飼育室(E棟9号室, ただし, 検疫はE棟2号室)で飼育した。

検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージ(W: 240×D: 380×H: 200 mm)を用いて1ケージ当たり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージ(W: 755×D: 210×H: 170 mm)を用いて個別飼育した。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。母動物は、妊娠18日以降オートクレーブ処理した床敷(サンフレーク, 日本チャールス・リバー株式会社)を入れたプラスチック製ケージ(W: 310×D: 360×H: 175 mm)で個別飼育し、自然分娩および哺育させた。ケージの受け皿, 給水瓶およびプラスチック製ケージの交換は1週間に2回以上, ステンレス製懸垂式ケージ, ステンレス製五連ケージおよび給餌器の交換は2週間に1回以上行った。なお、動物飼育室の清掃(床の掃き掃除)および0.02 %次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った。飼育期間終了時に採血したモニタリング動物の血清検査において、感染を示唆するような異常はみられなかった。

床敷の微量金属および汚染物質の分析結果は、ほぼ6カ月ごとに財団法人日本食品分析センターで実施した成績を日本チャールス・リバー株式会社から入手した。その分析結果は、

試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4) 飼料および飲料水

飼料は、入手後3カ月以内の固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌器に入れ、自由に摂取させた。ただし、雄は、投与終了日(投与49日)の夕刻(午後3時57分)から絶食した。使用した飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社から入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ6カ月ごとに財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した。

飼料および飲料水の検査結果は、いずれも試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4. 投与経路、投与方法、群構成、投与量および投与期間

1) 投与経路および投与方法

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンは、継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。

投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、5 mL/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日の体重を、授乳期間中は哺育0日の体重を基準とし、5 mL/kgで算出した。投与時刻は午前8時52分～12時00分の間で、投与回数は1日1回とした。

投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり、体重範囲は雄が311～347 g、雌が230～271 gであった。

2) 群構成および投与量

群構成は、以下に示したように被験物質投与群として4群を設定し、その他に対照群を設けた。1群の動物数は、雌雄それぞれ12匹とした。

群	試験群	投与量 (濃度)	雄(動物番号)	雌(動物番号)
第1群	対照(コソイル)	0 mg/kg (0 mg/mL)	12(001～012)	12(051～062)
第2群	1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン	2.5 mg/kg (0.5 mg/mL)	12(101～112)	12(151～162)
第3群	1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン	5 mg/kg (1 mg/mL)	12(201～212)	12(251～262)
第4群	1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン	10 mg/kg (2 mg/mL)	12(301～312)	12(351～362)
第5群	1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン	20 mg/kg (4 mg/mL)	12(401～412)	12(451～462)

投与量は、雄ラットを用いた2週間経口投与による予備試験²¹⁾(投与段階：0, 12.5, 25, 50および100 mg/kg)の結果により決定した。すなわち、死亡例が、25および50 mg/kg群で各1/5例、100 mg/kg群で4/5例認められた。また、12.5 mg/kg以上の群で流涎および前胃粘膜の肥厚、25 mg/kg以上の群で体重の低値あるいは低値傾向、50 mg/kg以上の群で摂餌量の低値がみられた。そこで、当試験では、20 mg/kgを最高用量とし、以下公比2により10, 5および2.5 mg/kgとした。また、対照として媒体(コーンオイル)のみを同容量投与する群を設けた。

3) 投与期間

投与期間は、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Testに従って、雄では交配前14日間とその後35日間の合計49日間とし、雌では交配前14日間、交配期間中(最長14日間)、妊娠期間中および哺育3日までの合計40～51日間とした。なお、投与開始日を投与1日とした。

5. 観察および検査項目

1) 雄(P)

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回(ただし、剖検日は剖検前1回)観察した。

(2) 体重測定

体重は、1週間に2回測定した(測定日：投与1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 49日および剖検日)。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間および交配期間終了後から1週間に2回測定した(残量測定日：投与3, 6, 10, 13, 31, 34, 38, 41, 45および48日)。

(4) 尿検査

投与期間終了前に採尿ケージを用いて絶食・給水下で3時間で採取した尿(3時間尿)と引き続いて給餌・給水下で21時間で採取した尿(21時間尿)ならびにそれらを合計した尿(24時間尿)について、以下の検査を実施した。なお、検査後の尿は廃棄した。

3時間尿：色調は、外観判定とした。pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンは、尿検査試験紙(栄研化学株式会社)に尿を滴下後に尿自動分析装置(US-2100, 栄研化学株式会社)を用いて検査した。尿沈渣は、沈渣を尿沈渣染色液で染色後に顕微鏡下で観察した。なお、採尿は、当日の検体投与後に行った。

21時間尿：比重(S.G.)を屈折率により屈折型尿比重計(ユリベット-II D, 株式会社ニコン)を用いて測定した。

24時間尿：尿量(UV)を比重と重量から算出した。

(5) 血液学検査

最終投与の翌日にペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与(40 mg/kg)による麻酔下で腹大動脈からカニュレーションにより血液を採取し、以下の血液学検査を実施した。な

お、測定後の残余血液は廃棄した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、血小板数(PLT)および白血球数(WBC)は、EDTA-2KコーティングしたSysmexサンプルカップに採取した血液について、多項目自動血球計数装置(Sysmex K-4500, シスメックス株式会社)を用いて測定した。さらに、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)および平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。

網状赤血球比率(RET)は、EDTA-2K処理した血液をBrecher法により超生体染色してスライドガラスに塗抹後、Giemsa染色標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の網状赤球数を計数し、算出した。

白血球百分率は、EDTA-2K処理した血液をスライドガラスに塗抹し、May-Giemsa染色標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)およびフィブリノーゲン濃度(FIB)は、3.13 %クエン酸ナトリウムで処理後、遠心分離(約4 °C, 3000 rpm, 15分間)して得た血漿について、散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスターII, 三共株式会社)を用いて測定した。

(6) 血液生化学検査

血液学検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液から遠心分離(約4 °C, 3000 rpm, 15分間)して得た血清について、以下の血液生化学検査を実施した。測定用の血清は測定時までは冷凍庫(-80 °C)内に保存し、保存用血清は最終報告書提出時まで冷凍庫(-80 °C)内に保管した。

ASTはMDH-UV法、ALTはLDH-UV法、ALPはp-ニトロフェニルリン酸基質法、 γ -GTPはL- γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法、総蛋白(TP)はBiuret法、総ビリルビン(T-Bil)は安定化ジアゾニウム塩法、尿素窒素(UN)はウレアーゼ・G1DH法、クレアチニン(CRE)はクレアチニナーゼ・F-DAOS法、ブドウ糖(Glu)はヘキソキナーゼ・G-6-PDH法、総コレステロール(T-Cho)はCOD-HDAOS法、トリグリセライド(TG)はGPO-HDAOS法、Caはo-CPC法、無機リン(IP)はPNP・XDH法、Na, KおよびClはイオン選択電極法により、いずれも生化学自動分析装置(AU 400, オリンパス光学工業株式会社)を用いて測定した。

アルブミン量(ALB)は総蛋白量および蛋白分画値[電気泳動法, 自動電気泳動装置(AES 310, オリンパス光学工業株式会社)]から、A/G(アルブミン/グロブリン)は蛋白分画値から算出した。

(7) 剖検および器官重量測定

上記の(5)および(6)で採血した動物をさらに放血致死させた後に剖検した。脳(大脳, 小脳, 延髄), 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣および精巣上体は重量を測定した。なお, 各器官重量を最終体重で除して相対重量も算出した。ただし, 下垂体および甲状腺重量は, 20 %中性緩衝ホルマリンで1晩固定後測定した。これらの器官は, 肺, 気管, 脾臓, 唾液腺(舌下腺・顎下腺), 食道, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, リンパ節(下顎・腸間膜), 膀胱, 精囊, 前立腺, 上皮小体, 脊髄, 坐骨神経, 眼球, ハーダー腺および骨髄(胸骨・大腿骨)とともに20 %中性緩衝ホルマリンで固

定した。ただし、精巣および精巣上体はブアン液で約24時間固定後90 %アルコールに再固定し、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリンで1晩固定後20 %中性緩衝ホルマリンに再固定した。

(8) 病理組織学検査

摘出した以下の器官・組織について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。なお、切り出し後の器官・組織は、10 %中性緩衝ホルマリンで保存した。

対照群および20 mg/kg群について、心臓、肺、気管、肝臓、膵臓、唾液腺(舌下腺・顎下腺)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胸腺、脾臓、リンパ節(下顎・腸間膜)、腎臓、副腎、膀胱、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、下垂体、甲状腺、上皮小体(検査可能な動物のみ)、脳(大脳・小脳・延髄)、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダー腺および骨髓(胸骨・大腿骨)についてHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。20 mg/kg群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた胃および心臓については、2.5, 5および10 mg/kg群についても同様に検査した。また、剖検で異常の認められた10 mg/kg群の1例(No.302)の精巣および精巣上体、1例(No.303)の精巣上体についても同様に検査した。なお、対照群および20 mg/kg群の精巣については、PAS-ヘマトキシリン染色組織標本も作製したが、これらの標本について鏡検の必要を認めなかったため、検査に供しなかった。

2) 雌(P)

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回(ただし、剖検日は剖検前1回)観察した。

死亡例は、発見後速やかに剖検し、妊娠黄体数および着床数を数え、胎児、胎盤、吸収胚、心臓、肺、気管、肝臓、膵臓、唾液腺(舌下腺・顎下腺)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胸腺、脾臓、リンパ節(下顎・腸間膜)、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膈、下垂体、甲状腺、上皮小体、脳(大脳・小脳・延髄)、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髓(胸骨・大腿骨)および乳腺を20 %中性緩衝ホルマリンで固定した。ただし、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリンで1晩固定後20 %中性緩衝ホルマリンに再固定した。

(2) 性周期

性周期は、投与開始日から交尾確認日まで毎日1回観察した。なお、発情期が連続2日間にわたって観察された場合は1回と計数した。

(3) 体重測定

体重は、交配開始前14日間および交配期間中は1週間に2回(測定日：投与1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25および29日)、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日に、哺育期間中は哺育0および4日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間までは1週間に2回測定した(残量測定日：投与3, 6, 10および13日)。また、妊娠期間中は妊娠2, 9, 16および21日に、哺育期間中は哺育4日に測定し

た。

(5) 交尾不成立雌

交尾不成立雌は、交配期間終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床の有無を確認した。着床のみられない雌は、脳(大脳、小脳、延髄)、下垂体、甲状腺、胸腺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および卵巣の重量を測定した。ただし、下垂体および甲状腺重量は、20 %中性緩衝ホルマリンで1晩固定後測定した。これらの器官は、肺、気管、脾臓、唾液腺(舌下腺・顎下腺)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、リンパ節(下顎・腸間膜)、膀胱、子宮、膣、上皮小体、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髓(胸骨・大腿骨)および乳腺とともに20 %中性緩衝ホルマリンで固定した。ただし、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリンで1晩固定後20 %中性緩衝ホルマリンに再固定した。

(6) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠21日から妊娠25日の午前10時まで毎日行った。午前10時に分娩が終了していた場合、その日を哺育0日とした。

(7) 哺育状態の観察

母動物は、哺育状態を哺育4日まで毎日観察した。

(8) 剖検および器官重量測定

新生児が全例死亡した日あるいは哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、妊娠黄体数および着床数を数えた。脳(大脳、小脳、延髄)、下垂体、甲状腺、胸腺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および卵巣は重量を測定した。ただし、下垂体および甲状腺重量は、20 %中性緩衝ホルマリンで1晩固定後測定した。これらの器官は、肺、気管、脾臓、唾液腺(舌下腺・顎下腺)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、リンパ節(下顎・腸間膜)、膀胱、子宮、膣、上皮小体、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髓(胸骨・大腿骨)、乳腺および剖検で異常の認められた器官・組織[対照群の1例(No.057)の乳腺の腫瘍]とともに20 %中性緩衝ホルマリンで固定した。ただし、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリンで1晩固定後20 %中性緩衝ホルマリンに再固定した。

(9) 病理組織学検査

摘出した以下の器官・組織について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。なお、切り出し後の器官・組織は、10 %中性緩衝ホルマリンで保存した。

対照群および20 mg/kg群(死亡例および交尾不成立雌を含む)について、心臓、肺、気管、肝臓、脾臓、唾液腺(舌下腺・顎下腺)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胸腺、脾臓、リンパ節(下顎・腸間膜)、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、下垂体、甲状腺、上皮小体(検査可能な動物のみ)、脳(大脳・小脳・延髄)、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髓(胸骨・大腿骨)、乳腺および剖検で異常の認められた器官・組織[対照群の1例(No.057)の乳腺の腫瘍]についてHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。20 mg/kg群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた胃および心臓については、2.5、5および10 mg/kg群についても同様に検査した。また、剖

検で異常の認められた5 mg/kg群の1例(No.256)の脾臓についても同様に検査した。

3) 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

14日間投与した雌雄を同一群内で1対1に組み合わせて同居交配した。交配期間は14日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、腔垢内に精子または腔栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠0日として起算した。

4) 新生児(F₁)

(1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。死産児は、20 %中性緩衝ホルマリンで固定し、保存した。

(2) 新生児の観察

新生児は、一般状態および死亡の有無を毎日1回観察した。死亡児は、剖検後20 %中性緩衝ホルマリンで固定し、保存した。

(3) 体重測定

体重は、哺育0日(出生日)および4日に測定した。

(4) 剖検

生存児は、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。剖検で異常の認められた出生児は、20 %中性緩衝ホルマリンで固定し、保存した。

6.統計学的方法

有意差検定は以下に示したように、対照群と各投与群の間で行い、危険率を5 %とし、5 %未満($p<0.05$)と1 %未満($p<0.01$)とに分けて表示した。新生児の体重は一腹の平均値と合計値も算出した。なお、不受胎雌の交尾後の一般状態、体重および摂餌量は集計から除外した。妊娠1日に死亡した20 mg/kg群の1例(No.461)では、妊娠の成否が不明であったため、受胎率の集計には用いなかった。また、妊娠19日に死亡した20 mg/kg群の1例(No.458)では、出産率の集計には用いなかった。

〈検定方法〉

体重(親動物、新生児)、摂餌量、尿量、尿比重、血液学検査、血液生化学検査、器官の絶対重量および相対重量、発情回数、交尾所要日数、妊娠期間〔分娩日(哺育0日)－交尾確認日〕、妊娠黄体数、着床数、着床率〔(着床数/妊娠黄体数)×100〕、総出産児数(新生児数+死産児数)、新生児数、死産児数、分娩率〔(総出産児数/着床数)×100〕、児の産出率〔(哺育0日の新生児数/着床数)×100〕、出生率〔(哺育0日の新生児数/総出産児数)×100〕、哺育4日の生存児数、哺育4日の生存率〔(哺育4日の生存児数/哺育0日の新生児数)×100〕、外表異常の出現率〔(外表異常児数/新生児数)×100〕、性比(雄/雌)および哺育4日の生存児の剖検での異常の出現率〔(剖検での異常児数/哺育4日の生存児数)×100〕は、各群で平均値および標準偏差を算出した。その後、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならばDunnett法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配

置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば順位を利用したDunnett型の検定法により行った。

交尾率 [(交尾成立動物数/同居動物数) × 100]，受胎率 [(受胎雌数/交尾成立動物数) × 100] および出産率 [(新生児出産雌数/受胎雌数) × 100] は、 χ^2 検定により行った。

なお、病理組織学検査において、20 mg/kg群の雌雄で毒性学的影響が示唆され他の用量群についても検査を実施した胃の所見については、対照群との群間比較を上記の順位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。そこで対照群との間に有意差が認められた場合は、Cochran・Armitageの傾向検定を用いて用量反応性の検定を行った。

結果

I. 反復投与毒性

1. 雄(P)に及ぼす影響

1) 一般状態(Table 1-1~1-5, Appendix 1-1~1-5)

死亡および瀕死例は、いずれの群でも認められなかった。

一般状態観察において、対照群および2.5 mg/kg群では異常はみられなかった。5 mg/kg群では、投与7日以降の投与後に一過性の流涎が2例みられた。10 mg/kg群では、投与6日以降の投与後に一過性の流涎が12例みられた。20 mg/kg群では、投与5日以降の投与後に一過性の流涎が12例みられた。また、20 mg/kg群では、投与38および39日に被毛の汚れが1例みられた。

2) 体重(Table 2, Fig.2, Appendix 2-1~2-5)

2.5, 5および10 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。20 mg/kg群では、対照群と比べて有意差は認められないものの、投与15~49日に体重の低値傾向がみられた。

3) 摂餌量(Table 3, Fig.3, Appendix 3-1~3-5)

2.5および5 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。10および20 mg/kg群では、対照群と比べて投与13日に摂餌量の有意な低値がみられた。

4) 尿検査(Table 4-1および4-2, Appendix 4-1~4-5)

各投与群とも、対照群と比べて尿量および比重に有意差はみられなかった。

色調、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンおよび沈渣は、各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。

5) 血液学検査(Table 5, Appendix 5-1~5-5)

2.5, 5および10 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定項目にも有意差はみられなかった。20 mg/kg群では、対照群と比べてAPTTの有意な低値、有意差は認められないもの

のPTの低値傾向がみられた。

6) 血液生化学検査(Table 6, Appendix 6-1~6-5)

20 mg/kg群では、対照群と比べて総蛋白およびアルブミン量の有意な低値がみられた。

その他、2.5 mg/kg群では、対照群と比べてNaの有意な低値がみられたが、投与量に依存したものではないことから、投与に基づく変化ではないと判断される。また、5および10 mg/kg群では、対照群と比べて無機リンの有意な高値がみられたが、投与量に依存したものではないことから、投与に基づく変化ではないと判断される。

7) 剖検(Table 7, Appendix 7-1~7-5)

対照群および2.5 mg/kg群では、いずれにも異常はみられなかった。5 mg/kg群では、前胃粘膜の潰瘍および浮腫が1例みられた。10 mg/kg群では、前胃粘膜の肥厚が1例みられた。20 mg/kg群では、前胃粘膜の肥厚が11例と潰瘍が9例みられた。

その他、10 mg/kg群では左精巣と左精巣上体の萎縮が1例(No.302)、右精巣上体に黄白色結節が1例(No.303)みられたが、これらの変化はいずれも偶発例と判断される。

8) 器官重量(Table 8, Appendix 8-1~8-5)

剖検日の体重において、2.5、5および10 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった。20 mg/kg群では、対照群と比べて有意差は認められないものの、体重の低値傾向がみられた。

器官重量において、2.5、5および10 mg/kg群では対照群と比べていずれの絶対および相対重量にも有意差はみられなかった。20 mg/kg群では、対照群と比べて脾臓の相対重量の有意な高値、有意差は認められないものの脾臓の絶対重量の高値傾向がみられた。

9) 病理組織学検査(Table 9, Appendix 9-1~9-5)

胃(Photo 1~5)：対照群および2.5 mg/kg群では、異常はみられなかった。5 mg/kg群では、前胃角化亢進および前胃上皮過形成が各2例、前胃粘膜への炎症細胞浸潤が3例みられ、それらの程度は前胃角化亢進が軽度、前胃上皮過形成が軽度~中等度、前胃粘膜への炎症細胞浸潤がごく軽度~軽度であった。10 mg/kg群では、前胃角化亢進、前胃上皮過形成および前胃粘膜への炎症細胞浸潤が各9例みられ、それらの程度はいずれもごく軽度~中等度であった。20 mg/kg群では、前胃角化亢進、前胃上皮過形成および前胃粘膜への炎症細胞浸潤が各12例、腺胃粘膜への炎症細胞浸潤および前胃のびらんが各2例みられ、それらの程度は前胃角化亢進および前胃上皮過形成が中等度~高度、前胃粘膜への炎症細胞浸潤が軽度~高度、腺胃粘膜への炎症細胞浸潤がごく軽度~軽度、前胃のびらんがごく軽度であった。

なお、胃における前胃角化亢進、前胃上皮過形成および前胃粘膜への炎症細胞浸潤は、10および20 mg/kg群で対照群と比べて有意差が認められ、用量相関性も確認された。

心臓：対照群では、異常はみられなかった。2.5 mg/kg群では、限局性の組織球浸潤が6例みられ、それらの程度はごく軽度~軽度であった。5 mg/kg群では、限局性の組織球浸潤が2例みられ、それらの程度は軽度であった。10 mg/kg群では、限局性の組織球浸潤が5例みられ、それらの程度はごく軽度であった。20 mg/kg群では、限局性の組織球浸潤が3例と心筋線維化が2例みられ、それらの程度は限局性の組織球浸潤がごく軽度、心筋線維化がご

く軽度および中等度であった。

その他の変化として以下に示した所見が得られた。

肝臓：微小肉芽腫が対照群で9例と20 mg/kg群で5例みられた。

脾臓：髄外造血が対照群で3例と20 mg/kg群で1例みられた。

腎臓：尿細管好塩基性変化が対照群で1例，尿細管硝子滴出現が対照群で2例と20 mg/kg群で1例，リンパ様細胞浸潤が20 mg/kg群で1例みられた。

精巣：10 mg/kg群で精細管萎縮およびライディヒ細胞過形成が1例みられた。なお，対照群および20 mg/kg群では，異常はみられなかった。

精巣上体：10 mg/kg群で精子減少が1例みられた。なお，対照群および20 mg/kg群では，異常はみられなかった。

前立腺：リンパ様細胞浸潤が対照群と20 mg/kg群で各6例みられた。

甲状腺：対照群で異所性胸腺が1例みられた。20 mg/kg群では，異常はみられなかった。

なお，これらの変化は，対照群でも通常観察される変化であり，また，対照群の出現頻度と比べて差がないことから，偶発的变化と判断された。

その他には，対照群および20 mg/kg群とも，肺，気管，脾臓，舌下腺，顎下腺，食道，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，胸腺，下顎リンパ節，腸間膜リンパ節，膀胱，精囊，下垂体，副腎，上皮小体，大脳，小脳，延髄，脊髄，坐骨神経，眼球，ハーダー腺および骨髄(胸骨，大腿骨)に異常はみられなかった。

2. 雌(P)に及ぼす影響

1) 一般状態(Table 10-1~10-2, 11-1~11-2および12, Appendix 10-1~10-5, 11-1~11-5および12-1~12-5)

死亡は，20 mg/kg群で3例(No.458:妊娠19日，No.460:投与5日，No.461:妊娠1日)認められた。

死亡例の一般状態観察において，投与後に一過性の流涎がみられた他には異常は認められなかった。

生存例の一般状態観察において，対照群および2.5 mg/kg群では異常はみられなかった。5 mg/kg群では，投与7日以降の投与後に一過性の流涎が2例みられた。10 mg/kg群では，投与7日以降の投与後に一過性の流涎が12例みられた。20 mg/kg群では，投与5日以降の投与後に一過性の流涎が9例みられた。なお，10 mg/kg群では，哺育0日に被毛の汚れが1例(No.359)みられたが，20 mg/kg群では認められないことから，投与に基づくものではないと考えられる。

2) 体重(Table 13~15, Fig.4および5, Appendix 13-1~13-5, 14-1~14-5および15-1~15-5)

交配開始前において，各投与群とも対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

妊娠期間中において，2.5, 5および10 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。20 mg/kg群では，対照群と比べて妊娠14日に体重の有意

な低値がみられた。

哺育期間中において、各投与群とも対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

3) 摂餌量 (Table 16~18, Fig.6および7, Appendix 16-1~16-5, 17-1~17-5および18-1~18-5)

交配開始前において、各投与群とも対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。

妊娠期間中において、2.5, 5および10 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。20 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠9日に摂餌量の有意な低値がみられた。

哺育期間中において、各投与群とも対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった。

4) 剖検 (Table 19-1および19-2, Appendix 19-1~19-5)

生存例においては、対照群では乳腺の腫瘍が1例 (No.057) みられた。2.5 mg/kg群では、いずれにも異常はみられなかった。5 mg/kg群では、脾臓の大型化および黄色結節、脾臓、肝臓と胃との癒着が1例 (No.256) みられたが、偶発例と判断される。10 mg/kg群では、前胃粘膜の肥厚および潰瘍が各1例みられた。20 mg/kg群では、前胃粘膜の肥厚が4例と潰瘍が3例みられた。

死亡例においては、20 mg/kg群の1例 (No.458) で前胃粘膜の潰瘍がみられたが、他の2例では異常は認められなかった。妊娠19日に死亡した1例 (No.458) では、子宮内に胎児が15例と胎盤が15個 (発育は正常) および吸収胚が1個みられた。なお、妊娠1日に死亡した1例 (No.461) では、妊娠の成否は不明であった。

5) 器官重量 (Table 20, Appendix 20-1~20-5)

剖検日の体重において、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、5および20 mg/kg群では対照群と比べていずれの絶対および相対重量にも有意差はみられなかった。2.5 mg/kg群では対照群と比べて甲状腺の相対重量の有意な低値、10 mg/kg群では脳および甲状腺の相対重量の有意な低値がみられたが、投与量に依存した変化ではないことから、投与に基づくものではないと考えられる。

6) 病理組織学検査

(1) 生存例 (Table 21, Appendix 21-1~21-5)

胃 (Photo 6~11): 対照群では、前胃潰瘍が1例みられ、その程度はごく軽度であった。2.5 mg/kg群では、前胃角化亢進および前胃上皮過形成が各5例、前胃粘膜への炎症細胞浸潤が1例みられ、それらの程度は前胃角化亢進および前胃上皮過形成がごく軽度~軽度、前胃粘膜への炎症細胞浸潤がごく軽度であった。5 mg/kg群では、前胃角化亢進および前胃上皮過形成が各4例、前胃粘膜への炎症細胞浸潤が3例、前胃潰瘍が1例みられ、それらの程度は前胃角化亢進がごく軽度~軽度、前胃上皮過形成が軽度~中等度、前胃粘膜への炎症細胞浸潤がごく軽度~軽度、前胃潰瘍がごく軽度であった。10 mg/kg群では、前胃角化亢進および前胃上皮過形成が各10例、前胃粘膜への炎症細胞浸潤が9例みられ、それらの程度は前胃角化亢進および前胃上皮過形成が軽度~中等度、前胃粘膜への炎症細胞浸潤がごく軽

度～中等度であった。20 mg/kg群では、前胃角化亢進および前胃上皮過形成が各9例、前胃粘膜への炎症細胞浸潤が8例、前胃潰瘍が3例みられ、それらの程度は前胃角化亢進および前胃上皮過形成が軽度～高度、前胃粘膜への炎症細胞浸潤がごく軽度～高度、前胃潰瘍がごく軽度であった。

なお、胃における前胃角化亢進、前胃上皮過形成および前胃粘膜への炎症細胞浸潤は、10および20 mg/kg群で対照群と比べて有意差が認められ、用量相関性も確認された。

心臓：対照群、2.5、5および10 mg/kg群では、異常はみられなかった。20 mg/kg群では、限局性の組織球浸潤が1例みられ、その程度はごく軽度であった。

その他の変化として以下に示した所見が得られた。

肝臓：髄外造血が対照群および20 mg/kg群で各1例みられた。

胸腺：対照群では、異常はみられなかった。20 mg/kg群では、皮質の萎縮が1例みられた。

脾臓：髄外造血が対照群で11例と20 mg/kg群で8例、広範壊死が5 mg/kg群で1例(No.256：剖検時に脾臓の大型化および黄色結節、脾臓、肝臓と胃との癒着を確認)みられた。

膀胱：対照群では、異常はみられなかった。20 mg/kg群で粘膜水腫が1例みられた。

甲状腺：対照群で異所性胸腺が1例みられた。20 mg/kg群では、異常はみられなかった。

乳腺：対照群では、右下顎部の腺癌が1例(No.057：剖検時に乳腺の腫瘍を確認)みられた。20 mg/kg群では、異常はみられなかった。

なお、これらの変化は、対照群でも通常観察される変化であり、また、対照群の出現頻度と比べて差がないことから、偶発的变化と判断された。

その他には、対照群および20 mg/kg群とも、肺、気管、脾臓、舌下腺、顎下腺、食道、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、卵巢、子宮、陰、腎臓、下垂体、副腎、上皮小体、大脳、小脳、延髄、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダ一腺および骨髓(胸骨、大腿骨)に異常はみられなかった。

(2) 死亡例(Appendix 21-6)

20 mg/kg群の3例(No.458, 460および461)とも、各組織に死後変化が認められ、組織学所見は得られなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

1) 発情回数(Table 22, Appendix 22-1～22-5)

交配前の投与期間(14日間)の発情回数は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

2) 交尾所要日数、交尾率、受胎雌数および受胎率(Table 22, Appendix 22-1～22-5)

未交尾の組み合わせは、20 mg/kg群で1組みられた。しかし、交尾率には各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。交尾所要日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

不受胎雌は、いずれの群にもみられなかった。ただし、20 mg/kg群の1例(No.461)は、妊娠1日に死亡し、妊娠の成否の確認ができなかったため受胎率の集計から除外した。したがって、受胎率はいずれの群とも100 %であった。

3) 妊娠期間および分娩状態(Table 23, Appendix 23-1~23-5)

妊娠期間は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

分娩状態において、対照群、2.5, 5および20 mg/kg群ではいずれの母動物にも異常はみられなかった。10 mg/kg群の1母動物(No.359)では、出産児が全例死亡(12例の死産児を確認)したため、新生児は得られなかった。

4) 妊娠黄体数、着床数および着床率(Table 23, Appendix 23-1~23-5)

各投与群とも、対照群と比べて妊娠黄体数、着床数および着床率に有意差はみられなかった。

5) 出産率および哺育状態(Table 23, Appendix 23-1~23-5)

出産率は、対照群、2.5, 5および20 mg/kg群では100 %であった。10 mg/kg群では、1母動物(No.359)で新生児が得られなかったため出産率は91.7 %であった。なお、20 mg/kg群の1母動物(No.458)は、妊娠19日に死亡したため出産率の集計から除外した。

哺育状態において、いずれの群とも異常はみられなかった。

2. 新生児(F₁)に及ぼす影響

1) 総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、哺育0日の性比、分娩率、児の産出率および出生率(Table 23, Appendix 23-1~23-5)

各投与群とも、対照群と比べて総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、哺育0日の性比、分娩率、児の産出率および出生率に有意差はみられなかった。なお、10 mg/kg群の1母動物(No.359)では、出産児が全例死亡(12例の死産児を確認)したが、その他の投与群において出生児全例死亡は認められなかったことから偶発例と考えられる。

2) 新生児の一般状態、哺育4日の生存児数、哺育4日の性比、哺育4日の生存率および外表異常(Table 23, Appendix 23-1~23-5)

各投与群とも、対照群と比べて哺育4日の生存児数、哺育4日の性比および哺育4日の生存率に有意差はみられなかった。

新生児の外表観察においては、対照群、2.5, 5および10 mg/kg群では異常はみられなかった。20 mg/kg群では、無尾がみられたが、1例(母動物No.452)のみで対照群と比べて有意差が認められないことから、偶発例と考えられる。

死産児においては、いずれの群とも異常はみられなかった。

新生児の一般状態において、いずれの群とも異常はみられなかった。

3) 新生児の体重(Table 24, Fig.8, Appendix 24-1~24-5)

各投与群とも、対照群と比べて哺育0および4日の雌雄別平均、腹平均および腹合計の体重に有意差はみられなかった。

4) 生存児の剖検(Table 25, Appendix 25-1~25-5)

対照群、2.5, 5および10 mg/kg群では、異常はみられなかった。20 mg/kg群では、外表

観察で認められた無尾が1例みられたが、有意差は認められなかった。

5) 死亡児の剖検

いずれの群とも、異常はみられなかった。

考察

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、20 mg/kgを最高用量とし、以下公比2により10, 5および2.5 mg/kgとした。対照として媒体(コーンオイル)投与群を設けた。

雄に関しては、死亡および瀕死例はいずれの群にも認められなかった。一般状態では、20 mg/kg群で投与38および39日に被毛の汚れが1例認められたが、一過性のものであることから、軽微な変化と考えられる。なお、5, 10および20 mg/kg群で投与後に一過性の流涎がみられたが、痙攣などの神経症状は認められないことから、被験物質の刺激性に基づくものと判断され、毒性症状とはみなさなかった。体重において、20 mg/kg群でほぼ投与期間を通して低値傾向がみられた。また、摂餌量においては、10および20 mg/kg群で投与13日に一過性の低値がみられた。投与期間終了前の尿検査において異常はみられなかった。投与期間終了時の血液学検査において20 mg/kg群でPTおよびAPTTの低値傾向あるいは低値、血液生化学検査において20 mg/kg群で総蛋白およびアルブミン量の低値がみられた。剖検では、5 mg/kg群で前胃粘膜の潰瘍および浮腫が1例、10 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚が1例、20 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚が11例と潰瘍が9例みられた。また、器官重量では、20 mg/kg群で脾臓の絶対および相対重量の高値傾向あるいは高値がみられた。病理組織学検査において、胃では5, 10および20 mg/kg群で前胃角化亢進、前胃上皮過形成および前胃粘膜への炎症細胞浸潤、20 mg/kg群ではさらに腺胃粘膜への炎症細胞浸潤および前胃のびらんがみられた。以上のように、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの一般毒性学的影響としては胃への影響が顕著であった。血液生化学検査において認められた総蛋白およびアルブミン量の低値、器官重量で認められた脾臓の絶対および相対重量の高値傾向あるいは高値は、関連した器官・組織に病理組織学影響はみられなかったことから、軽微な変化と考えられる。なお、病理組織学検査において、心臓に限局性の組織球浸潤が2.5 mg/kg群で6例、5 mg/kg群で2例、10 mg/kg群で5例、20 mg/kg群で3例みられたが、投与量との関連が明確ではないこと、限局性の組織球浸潤は対照群でも通常認められることから、偶発例と考えられ、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンによる影響ではないと判断される。

雌に関しては、20 mg/kg群で3例が死亡した。なお、20 mg/kg群の死亡例では、各組織に死後変化が認められ、病理組織学的に死因を明らかにできなかったが、剖検において前胃粘膜の潰瘍が1例認められていることから、消化管障害が死因の一部と考えられる。一般状態観察において、雄の場合と同様に5, 10および20 mg/kg群で認められた流涎は毒性症状と

はみなさなかった。体重において、20 mg/kg群では、妊娠期に一過性の低値がみられた。摂餌量において、20 mg/kg群では、妊娠期に一過性の低値がみられた。剖検において、10 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚および潰瘍が各1例、20 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚が4例と潰瘍が3例みられた。しかし、器官重量では、投与に起因する変化はみられなかった。病理組織学検査において、生存例の胃において2.5, 5, 10および20 mg/kg群では、前胃角化亢進、前胃上皮過形成および前胃粘膜への炎症細胞浸潤がみられた。5および20 mg/kg群では、さらに前胃潰瘍がみられたが、対照群においても1例認められている。なお、20 mg/kg群の死亡例では、各組織に死後変化が認められ、組織学所見は得られなかった。以上のように、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの一般毒性学的影響としては雄の場合と同様に胃への影響が顕著であった。なお、病理組織学検査において、心臓に限局性の組織球浸潤が20 mg/kg群で1例みられたが、雄と同様に偶発例と考えられ、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンによる影響ではないと判断される。

したがって、当試験条件下における1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの一般毒性学的無影響量は、雄が2.5 mg/kg/day、雌が2.5 mg/kg/day未満と考えられる。

親動物の生殖発生に対しては、前述したように20 mg/kg群でも精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膣および乳腺に病理組織学変化は認められなかった。また、発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎率、妊娠黄体数、着床数、着床率、出産率、妊娠期間、分娩状態および哺育状態では、投与に起因する変化はみられなかった。

児動物に対しては、総出産児数、分娩率、哺育0日の新生児数、児の産出率、性比、死産児数、出生率、一般状態、哺育4日の新生児数、生存率では投与に起因する変化はみられなかった。新生児の外表観察において、投与に起因する変化はみられなかった。児動物の体重では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。児動物の剖検では、投与に起因する変化はみられなかった。

したがって、当試験条件下における1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄親動物、児動物とも20 mg/kg/dayと考えられる。

以上のように、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの一般毒性学的無影響量は、雄では5 mg/kg投与により胃に影響が認められたことから2.5 mg/kg/day、雌では2.5 mg/kg投与により胃に影響が認められたことから2.5 mg/kg/day未満と考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄とも20 mg/kg投与してもいずれの観察項目にも影響は認められなかったことから20 mg/kg/dayと考えられる。児動物では、20 mg/kg投与してもいずれの観察項目にも影響は認められなかったことから20 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 渡邊ゆかりほか：1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの調製液の安定性確認試験(試験番号：401218P)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)

- 2) 古橋忠和ほか：1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンのラットを用いる経口投与による
反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験の予備試験(試験番号：500718P)(株式会社日本バ
イオリサーチセンター 羽島研究所)

Table 1-1 General signs of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration																	
			1		2		3		4		5		6		7		8		9	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-	2.5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12
	10	Number of males Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	20	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	12	7	12	4	12	2
	20	Number of males Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	5	0	8	0	10
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Be: before administration, Af: after administration.

Table 1-2 General signs of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration																			
			11		12		13		14		15		16		17		18		19		20	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-	2.5	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	5	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Salivation	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	5	12	7	12	6	12	5	12	10	12	9	12	9	12	10	12	9	12	9
		Salivation	0	7	0	5	0	6	0	7	0	2	0	3	0	3	0	2	0	3	0	3
	20	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	0	12	2	12	2	12	1	12	2	12	3	12	3	12	4	12	5	12	4
		Salivation	0	12	0	10	0	10	0	11	0	10	0	9	0	9	0	8	0	7	0	8

Be: before administration, Af: after administration.

Table 1-3 General signs of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration																			
			21		22		23		24		25		26		27		28		29		30	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-	2.5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	10	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	10	12	11	12	10	12	9	12	10	12	10	12	9	12	9	12	9	12	9
		Salivation	0	2	0	1	0	2	0	3	0	2	0	2	0	3	0	3	0	3	0	3
	20	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	4	12	4	12	6	12	3	12	2	12	2	12	3	12	2	12	5	12	4
			Salivation	0	8	0	8	0	6	0	9	0	10	0	10	0	9	0	10	0	7	0

Be: before administration, Af: after administration.

Table 1-4 General signs of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration																			
			31		32		33		34		35		36		37		38		39		40	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-	2.5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	10	Number of males Normal Salivation	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	6	12	7	12	4	12	6	12	6	12	8	12	6	12	9	12	10	12	9
			0	6	0	5	0	8	0	6	0	6	0	4	0	6	0	3	0	2	0	3
	20	Number of males Normal Soiled fur Salivation	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	4	12	4	12	2	12	1	12	3	12	2	12	2	11	2	11	4	12	3
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
			0	8	0	8	0	10	0	11	0	9	0	10	0	10	0	10	0	8	0	9

Be: before administration, Af: after administration.

Table 1-5 General signs of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration																		
			41		42		43		44		45		46		47		48		49		50
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-	2.5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	10	Number of males Normal Salivation	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	8	12	7	12	11	12	10	12	11	12	11	12	9	12	10	12	10	12
			0	4	0	5	0	1	0	2	0	1	0	1	0	3	0	2	0	2	0
	20	Number of males Normal Salivation	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	3	12	2	12	3	12	4	12	4	12	2	12	2	12	3	12	3	12
			0	9	0	10	0	9	0	8	0	8	0	10	0	10	0	9	0	9	0

Be: before administration, Af: after administration.

Table 2 Body weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Control		1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-							
		0		2.5		5		10		20	
Number of males		12		12		12		12		12	
Days of admin- istration	1	328.1 ± 9.8		327.8 ± 10.0		327.6 ± 10.2		327.7 ± 10.2		327.3 ± 9.3	
	4	336.6 ± 13.7		336.0 ± 10.3		337.9 ± 13.8		332.8 ± 11.4		331.2 ± 11.3	
	8	355.5 ± 11.9		353.8 ± 12.6		355.4 ± 17.1		347.9 ± 11.2		348.4 ± 10.4	
	11	368.7 ± 10.6		367.9 ± 11.8		372.3 ± 18.7		363.7 ± 14.6		360.5 ± 17.8	
	15	385.4 ± 13.3		381.9 ± 11.6		387.9 ± 22.4		372.6 ± 16.3		370.9 ± 13.3	
	18	394.8 ± 12.6		393.3 ± 14.0		397.5 ± 24.3		383.0 ± 18.5		380.7 ± 14.5	
	22	414.2 ± 17.8		413.5 ± 15.6		416.1 ± 27.5		398.5 ± 20.9		399.3 ± 13.6	
	25	424.8 ± 19.6		424.2 ± 15.7		427.4 ± 28.4		408.2 ± 23.1		407.7 ± 15.1	
	29	438.5 ± 22.9		439.5 ± 20.2		443.0 ± 34.2		418.3 ± 22.4		422.0 ± 17.8	
	32	447.0 ± 22.4		449.0 ± 24.2		449.2 ± 33.8		428.5 ± 22.6		431.6 ± 19.2	
	36	458.6 ± 23.7		461.3 ± 27.4		463.5 ± 35.6		440.3 ± 26.4		441.8 ± 17.9	
	39	465.7 ± 25.8		467.3 ± 27.8		471.3 ± 38.2		449.7 ± 26.8		443.7 ± 25.7	
	43	476.3 ± 26.8		479.3 ± 29.7		484.7 ± 39.5		462.6 ± 29.8		452.5 ± 22.5	
	46	474.8 ± 21.5		480.8 ± 28.4		485.2 ± 41.6		465.4 ± 27.5		448.8 ± 23.0	
	49	485.3 ± 26.9		487.8 ± 31.9		491.4 ± 43.5		474.3 ± 31.5		459.4 ± 23.6	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 3 Food consumption of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-							
	0		2.5		5		10		20	
Number of males	12		12		12		12		12	
Days of admin- istration										
3	18.8 ±	2.6	17.2 ±	1.9	19.9 ±	3.2	18.1 ±	3.9	17.5 ±	3.3
6	20.5 ±	2.5	20.8 ±	2.0	21.3 ±	3.6	19.5 ±	1.6	20.4 ±	3.0
10	21.9 ±	2.5	21.9 ±	1.4	23.5 ±	2.3	22.5 ±	2.6	22.6 ±	1.7
13	22.8 ±	2.6	21.3 ±	1.5	22.3 ±	2.1	19.1 ±	3.6**	17.8 ±	4.6**
31	19.9 ±	2.0	20.1 ±	2.1	20.9 ±	3.2	21.0 ±	2.0	20.1 ±	2.0
34	20.9 ±	2.0	20.6 ±	2.5	21.5 ±	2.8	20.3 ±	2.4	20.3 ±	1.5
38	21.1 ±	2.2	20.8 ±	3.7	20.4 ±	2.6	20.4 ±	3.1	18.7 ±	5.1
41	20.3 ±	2.3	19.9 ±	2.0	20.6 ±	2.8	20.7 ±	2.6	19.0 ±	1.8
45	19.8 ±	2.4	19.2 ±	1.9	21.0 ±	2.4	19.9 ±	2.1	18.9 ±	2.6
48	20.8 ±	2.0	19.5 ±	1.9	21.3 ±	2.3	21.1 ±	2.6	19.4 ±	2.4

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Table 4-1 Urinary examination of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0	2.5	5	10	20	
Number of males	12	12	12	12	12	
Volume (mL): Mean $\pm$ S.D.	11.44 $\pm$ 4.71	12.77 $\pm$ 3.73	14.27 $\pm$ 6.33	14.75 $\pm$ 7.26	11.23 $\pm$ 6.84	
Specific gravity: Mean $\pm$ S.D.	1.0543 $\pm$ 0.0175	1.0481 $\pm$ 0.0109	1.0438 $\pm$ 0.0150	1.0439 $\pm$ 0.0165	1.0536 $\pm$ 0.0179	
Color						
Light yellow	12	12	12	12	12	
pH						
6.5	0	1	0	1	4	
7.0	1	0	1	0	2	
7.5	0	1	0	1	0	
8.0	3	2	2	1	0	
8.5	7	7	7	6	4	
9.0	1	1	2	3	2	
Protein						
10~20 mg/dL	1	0	2	2	1	
30 mg/dL	8	7	4	5	1	
100 mg/dL	2	5	6	5	8	
300 mg/dL	1	0	0	0	2	
Glucose						
Negative	12	12	12	12	12	
Ketone body						
Negative	8	5	8	7	7	
Slight	4	7	4	4	4	
Moderate	0	0	0	1	1	
Bilirubin						
Negative	12	12	12	12	12	
Occult blood						
Negative	11	9	11	12	9	
Trace	1	3	1	0	3	
Urobilinogen						
Normal	12	12	12	12	12	

Table 4-2 Urinary examination of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0	2.5	5	10	20
Number of males	12	12	12	12	12
Urinary sediments					
Epithelial cells					
0~20 cells/100 fields	11	12	11	12	10
21~100 cells/100 fields	1	0	1	0	2
Erythrocytes					
0~20 cells/100 fields	11	12	11	12	12
21~100 cells/100 fields	1	0	1	0	0
Leukocytes					
0~20 cells/100 fields	12	12	12	12	12
Casts					
Not observed	12	12	12	12	12
Crystals					
Not observed	4	7	7	7	6
Observed	8	5	5	5	6

Table 5 Hematological examination of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-							
	0		2.5		5		10		20	
Number of males	12		12		12		12		12	
RBC (10 ⁴ /μL)	848.4 ±	48.8	835.8 ±	44.1	859.6 ±	44.1	838.1 ±	39.7	836.0 ±	24.8
HGB (g/dL)	15.66 ±	0.65	15.77 ±	0.32	15.83 ±	0.64	15.50 ±	0.81	15.35 ±	0.45
HCT (%)	46.80 ±	2.14	46.55 ±	1.40	46.79 ±	1.99	46.18 ±	2.49	45.60 ±	1.45
MCV (fL)	55.21 ±	1.43	55.76 ±	1.68	54.47 ±	1.42	55.11 ±	1.20	54.56 ±	1.47
MCH (pg)	18.48 ±	0.68	18.90 ±	0.80	18.42 ±	0.61	18.50 ±	0.46	18.37 ±	0.59
MCHC (g/dL)	33.48 ±	0.71	33.88 ±	0.63	33.85 ±	0.46	33.58 ±	0.49	33.68 ±	0.60
PLT (10 ⁴ /μL)	98.75 ±	5.76	92.58 ±	28.01	103.56 ±	7.40	100.08 ±	9.48	104.18 ±	11.74
RET (%)	23.5 ±	2.7	24.9 ±	6.6	24.2 ±	5.2	26.2 ±	5.2	23.1 ±	4.6
PT (SEC.)	20.59 ±	4.51	20.28 ±	5.07	20.59 ±	4.13	19.91 ±	4.00	17.79 ±	1.86
APTT (SEC.)	32.34 ±	3.72	31.13 ±	2.60	33.61 ±	3.00	32.30 ±	3.59	28.93 ±	2.02*
FIB (mg/dL)	219.7 ±	11.3	219.5 ±	22.9	226.3 ±	17.1	210.3 ±	12.6	211.6 ±	22.1
WBC (10 ³ /μL)	71.2 ±	17.1	71.6 ±	13.3	76.3 ±	20.0	63.4 ±	16.2	79.5 ±	20.4
Differential leukocyte (%)										
Lymphocyte	89.3 ±	3.9	90.2 ±	4.6	89.7 ±	4.1	90.0 ±	3.1	87.8 ±	3.9
Neutrophil	9.6 ±	4.0	9.0 ±	4.3	9.3 ±	3.5	9.1 ±	2.7	11.2 ±	3.5
Eosinophil	0.4 ±	0.5	0.3 ±	0.7	0.6 ±	0.9	0.4 ±	0.7	0.6 ±	0.8
Basophil	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0
Monocyte	0.7 ±	0.8	0.5 ±	0.5	0.5 ±	0.7	0.5 ±	0.7	0.5 ±	0.7

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (*: P<0.05).

Table 6 Blood chemical examination of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-									
	0		2.5		5		10		20			
Number of males	12		12		12		12		12		12	
AST (IU/L)	92.83 ±	24.30	86.52 ±	15.43	98.11 ±	24.69	94.23 ±	15.21	89.68 ±	9.17		
ALT (IU/L)	29.84 ±	12.46	26.73 ±	3.59	32.93 ±	12.23	30.11 ±	5.43	31.24 ±	8.91		
ALP (IU/L)	362.21 ±	104.98	386.64 ±	96.01	351.28 ±	80.42	333.62 ±	57.94	303.29 ±	77.43		
γ-GTP (IU/L)	1.263 ±	0.170	1.198 ±	0.140	1.215 ±	0.087	1.285 ±	0.156	1.205 ±	0.140		
TP (g/dL)	5.43 ±	0.22	5.43 ±	0.19	5.46 ±	0.28	5.22 ±	0.16	5.15 ±	0.22**		
Alb (g/dL)	2.788 ±	0.100	2.796 ±	0.116	2.793 ±	0.156	2.772 ±	0.100	2.623 ±	0.155**		
A/G ratio	1.057 ±	0.040	1.066 ±	0.068	1.048 ±	0.068	1.142 ±	0.106	1.040 ±	0.084		
T-Bil (mg/dL)	0.123 ±	0.017	0.108 ±	0.024	0.124 ±	0.018	0.118 ±	0.022	0.124 ±	0.025		
UN (mg/dL)	14.29 ±	1.67	15.53 ±	2.07	15.60 ±	1.82	15.66 ±	2.10	14.81 ±	1.34		
CRE (mg/dL)	0.257 ±	0.027	0.272 ±	0.025	0.259 ±	0.021	0.256 ±	0.040	0.254 ±	0.026		
Glu (mg/dL)	112.22 ±	9.42	113.35 ±	10.07	112.83 ±	11.85	116.49 ±	11.13	106.45 ±	7.62		
T-Chol (mg/dL)	51.14 ±	10.93	49.47 ±	5.87	48.68 ±	7.08	44.02 ±	8.11	50.93 ±	6.74		
TG (mg/dL)	34.38 ±	21.25	40.22 ±	14.94	28.54 ±	7.97	31.12 ±	14.23	30.79 ±	9.76		
Na (mEq/L)	146.82 ±	1.15	145.74 ±	0.89*	146.43 ±	0.90	146.20 ±	1.01	147.03 ±	0.72		
K (mEq/L)	4.454 ±	0.153	4.518 ±	0.233	4.558 ±	0.201	4.632 ±	0.239	4.537 ±	0.196		
Cl (mEq/L)	107.14 ±	1.00	106.81 ±	1.26	106.83 ±	1.36	107.19 ±	0.78	107.48 ±	1.13		
Ca (mg/dL)	9.40 ±	0.24	9.54 ±	0.25	9.43 ±	0.21	9.37 ±	0.16	9.21 ±	0.20		
IP (mg/dL)	7.04 ±	0.45	7.34 ±	0.55	7.63 ±	0.58*	7.71 ±	0.67*	7.58 ±	0.31		

Each value shows mean ± S.D.

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

Table 7 Necropsy findings of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group	Control	1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
(mg/kg)	0	2.5	5	10	20
Number of males	12	12	12	12	12
Findings					
Normal	12	12	11	10	1
Forestomach(mucosa)					
Thickening	0	0	0	1	11
Ulcer	0	0	1	0	9
Edema	0	0	1	0	0
Testis					
Atrophy(left)	0	0	0	1	0
Epididymis					
Yellow white nodule(cauda)(right)	0	0	0	1	0
Atrophy(left)	0	0	0	1	0

Table 8 Organ weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-									
	0		2.5		5		10		20			
Number of males	12		12		12		12		12		12	
Body weight (g)	465.5 ±	27.0	467.8 ±	29.2	473.1 ±	40.3	453.6 ±	27.9	438.3 ±	22.6		
Brain (g)	2.053 ±	0.071	2.068 ±	0.143	2.072 ±	0.085	2.105 ±	0.084	2.080 ±	0.067		
	(g%) 0.443 ±	0.025	(g%) 0.443 ±	0.045	(g%) 0.440 ±	0.040	(g%) 0.465 ±	0.030	(g%) 0.477 ±	0.027		
Pituitary (mg)	13.78 ±	1.83	13.04 ±	2.20	14.74 ±	1.96	14.53 ±	1.06	13.81 ±	1.28		
	(mg%) 2.97 ±	0.34	(mg%) 2.81 ±	0.51	(mg%) 3.11 ±	0.28	(mg%) 3.21 ±	0.26	(mg%) 3.17 ±	0.34		
Thyroids (mg)	18.08 ±	2.21	17.78 ±	3.25	17.52 ±	3.60	18.80 ±	4.82	18.26 ±	3.72		
	(mg%) 3.88 ±	0.40	(mg%) 3.82 ±	0.65	(mg%) 3.73 ±	0.79	(mg%) 4.14 ±	1.07	(mg%) 4.18 ±	0.82		
Thymus (mg)	310.38 ±	61.50	333.18 ±	53.43	290.47 ±	73.88	322.13 ±	62.21	289.68 ±	73.27		
	(mg%) 66.66 ±	12.32	(mg%) 71.13 ±	10.37	(mg%) 61.25 ±	13.75	(mg%) 70.85 ±	12.17	(mg%) 66.17 ±	16.90		
Heart (g)	1.503 ±	0.137	1.459 ±	0.099	1.522 ±	0.112	1.420 ±	0.116	1.401 ±	0.122		
	(g%) 0.324 ±	0.030	(g%) 0.313 ±	0.027	(g%) 0.323 ±	0.033	(g%) 0.314 ±	0.020	(g%) 0.321 ±	0.028		
Liver (g)	12.331 ±	1.239	12.595 ±	1.612	12.412 ±	1.399	12.391 ±	0.991	11.862 ±	0.801		
	(g%) 2.645 ±	0.160	(g%) 2.688 ±	0.261	(g%) 2.619 ±	0.136	(g%) 2.734 ±	0.170	(g%) 2.707 ±	0.113		
Spleen (g)	0.773 ±	0.120	0.733 ±	0.071	0.773 ±	0.073	0.763 ±	0.100	0.847 ±	0.141		
	(g%) 0.166 ±	0.025	(g%) 0.158 ±	0.011	(g%) 0.164 ±	0.017	(g%) 0.169 ±	0.023	(g%) 0.193 ±	0.033*		
Kidneys (g)	3.053 ±	0.222	3.091 ±	0.316	3.083 ±	0.339	3.090 ±	0.259	2.976 ±	0.236		
	(g%) 0.658 ±	0.049	(g%) 0.664 ±	0.080	(g%) 0.653 ±	0.048	(g%) 0.682 ±	0.035	(g%) 0.681 ±	0.068		
Adrenals (mg)	62.50 ±	8.74	59.87 ±	9.67	58.83 ±	8.15	62.38 ±	9.58	64.23 ±	10.05		
	(mg%) 13.46 ±	1.98	(mg%) 12.83 ±	1.95	(mg%) 12.43 ±	1.47	(mg%) 13.82 ±	2.43	(mg%) 14.71 ±	2.45		
Testes (g)	3.406 ±	0.289	3.360 ±	0.258	3.253 ±	0.339	3.258 ±	0.332	3.305 ±	0.283		
	(g%) 0.736 ±	0.080	(g%) 0.719 ±	0.061	(g%) 0.693 ±	0.086	(g%) 0.721 ±	0.078	(g%) 0.756 ±	0.068		
Epididymides (g)	0.736 ±	0.091	0.665 ±	0.186	0.698 ±	0.155	0.698 ±	0.196	0.605 ±	0.147		
	(g%) 0.159 ±	0.020	(g%) 0.143 ±	0.042	(g%) 0.148 ±	0.033	(g%) 0.154 ±	0.039	(g%) 0.138 ±	0.034		

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (*: P<0.05).

Table 9 Histopathological findings of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control						1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-																															
	0						2.5						5						10						20													
Incidence & Grade	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+								
Findings																																						
Heart	[12]							[12]							[12]							[12]							[12]									
Cellular infiltration, histiocyte, focal	12	0							6	6	4	2	0	0	10	2	0	2	0	0	7	5	5	0	0	0	9	3	3	0	0	0						
Fibrosis, myocardial	12	0							12	0							12	0							12	0							10	2	1	0	1	0
Liver	[12]							[0]							[0]							[0]							[12]									
Microgranuloma	3	9	5	4	0	0																			7	5	1	4	0	0								
Stomach	[12]							[12]							[12]							[12]							[12]									
Hyperkeratosis, forestomach	12	0							12	0							10	2	0	2	0	0	3	9	2	6	1	0	**	0	12	0	0	6	6	**##		
Hyperplasia, epithelium, forestomach	12	0							12	0							10	2	0	1	1	0	3	9	2	4	3	0	**	0	12	0	0	1	11	**##		
Cellular infiltration, inflammatory cell, mucosa, forestomach	12	0							12	0							9	3	1	2	0	0	3	9	4	2	3	0	**	0	12	0	4	4	4	**##		
Cellular infiltration, inflammatory cell, mucosa, glandular stomach	12	0							12	0							12	0							12	0							10	2	1	1	0	0
Erosion, forestomach	12	0							12	0							12	0							12	0							10	2	2	0	0	0
Spleen	[12]							[0]							[0]							[0]							[12]									
Hematopoiesis, extramedullary	9	3	3	0	0	0																			11	1	1	0	0	0								
Kidney	[12]							[0]							[0]							[0]							[12]									
Basophilic change, tubular epithelium	11	1	1	0	0	0																			12	0							11	1	1	0	0	0
Hyaline droplet, tubular epithelium	10	2	2	0	0	0																			11	1	1	0	0	0								
Cellular infiltration, lymphoid cell	12	0																									11	1	1	0	0	0						
Testis	[12]							[0]							[0]							[1]							[12]									
Atrophy, seminiferous tubule	12	0																			0	1	0	0	1	0	12	0										
Hyperplasia, Leydig's cell	12	0																			0	1	0	1	0	0	12	0										
Epididymis																																						
Decrease, sperm	12	0																			1	1	0	0	1	0	12	0										
Prostate	[12]							[0]							[0]							[0]							[12]									
Cellular infiltration, lymphoid cell	6	6	6	0	0	0																			6	6	5	1	0	0								
Thyroid	[12]							[0]							[0]							[0]							[12]									
Ectopic thymic tissue	11	1	1	0	0	0																			12	0												

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked. N: No abnormality detected. A: Abnormality detected. []: Number of males examined.

No remarkable changes were seen in lung, trachea, pancreas, salivary gland(sublingual and submandibular), esophagus, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, thymus, lymph node (submandibular and mesenteric), urinary bladder, seminal vesicle, pituitary, adrenal, parathyroid, brain(cerebrum, cerebellum and medulla oblongata), spinal cord, sciatic nerve, eyeball, Harderian gland and bone marrow(sternum and femur).

Examined only heart and stomach in the 2.5,5,10 mg/kg group, testis in the only one male and epididymis in the two male in the 10 mg/kg group.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Significantly different by dose response test (##: P<0.01).

Table 10-1 General signs of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of females and general signs	Days of administration																											
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-	2.5	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
	5	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12		
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	9	12	11	12	7	12	7	12	9	12	8	12	10	
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	1	0	5	0	5	0	3	0	4	0	2	
	20	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	11	6	11	3	11	4	11	3	11	4	11	3	11	2	11	2	11	1	11	4
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	8	0	7	0	8	0	7	0	8	0	9	0	9	0	10	0	7
		Death	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Be: before administration, Af: after administration.

Table 10-2 General signs of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of females and general signs	Days of administration																												
			15*		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26		27		28		29
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	
Control	0	Number of females	12	12	11	11	8	8	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Normal	12	12	11	11	8	8	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-	2.5	Number of females	12	12	9	9	6	6	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Normal	12	12	9	9	6	6	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	Number of females	12	12	9	9	6	6	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Normal	12	11	9	9	6	6	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Salivation	0	1	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	10	Number of females	12	12	11	11	7	7	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
		Normal	12	10	11	9	7	6	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-
		Salivation	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
	20	Number of females	11	11	9	9	6	6	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
		Normal	11	6	9	2	6	2	4	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	0	2	0	2	0	1	0	1	0	1
	Salivation	0	5	0	7	0	4	0	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	2	0	2	0	1	0	1	0	

Be: before administration, Af: after administration.

*: commencement of pairing.

Table 11-1 General signs of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of dams and general signs	Days of pregnancy																											
			0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12			
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af		
Control	0	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-	2.5	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12				
	5	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12				
	10	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
			12	11	12	8	12	11	12	10	12	10	12	8	12	10	12	10	12	11	12	10	12	9	12	11	12	11		
	20	Salivation	0	1	0	4	0	1	0	2	0	2	0	4	0	2	0	2	0	1	0	2	0	3	0	1	0	1		
			Number of dams	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9		
				Normal	10	4	9	5	9	5	9	4	9	4	9	4	9	4	9	3	9	3	9	3	9	3	9	4	9	4
					Salivation	0	6	0	4	0	4	0	5	0	5	0	5	0	5	0	6	0	6	0	6	0	6	0	5	0
Death	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				

Be: before administration, Af: after administration.

Table 11-2 General signs of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of dams and general signs	Days of pregnancy																					
			13		14		15		16		17		18		19		20		21		22		23	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	2	0	0
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	2	-	-
1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-	2.5	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	5	0	0
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	5	-	-
	5	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	4	0	0
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	4	-	-
	10	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	5	1	1
		Normal	12	12	12	11	12	9	12	7	12	8	12	7	12	9	12	9	12	9	5	5	1	1
		Salivation	0	0	0	1	0	3	0	5	0	4	0	5	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0
	20	Number of dams	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	3	3	0	0
		Normal	9	5	9	4	9	6	9	3	9	3	9	3	8	2	8	3	8	3	3	1	-	-
		Salivation	0	4	0	5	0	3	0	6	0	6	0	6	0	6	0	5	0	5	0	2	-	-
Death		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-	-	

Be: before administration, Af: after administration.

Table 12 General signs of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of dams and general signs	Days of lactation									
			0		1		2		3		4	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-	2.5	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	5	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	10	Number of dams	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11
		Normal	11	9	11	8	11	10	11	11	11	11
		Soiled fur	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Salivation	0	2	0	3	0	1	0	0	0	0
	20	Number of dams	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Normal	8	2	8	4	8	4	8	6	8	8
		Salivation	0	6	0	4	0	4	0	2	0	0

Be: before administration, Af: after administration.

Table 13 Body weight of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-							
	0		2.5		5		10		20	
Number of females	12		12		12		12		12	
Days of admin- istration	1	250.1 ± 10.1	250.0 ± 11.0	249.7 ± 10.1	249.1 ± 10.4	249.8 ± 9.9				
	4	251.0 ± 13.8	251.8 ± 10.9	249.8 ± 10.4	249.5 ± 8.1	250.4 ± 12.0				
	8	260.1 ± 14.7	260.1 ± 11.5	257.3 ± 11.5	259.6 ± 8.1	260.1 ± 10.2	(11)			
	11	263.7 ± 14.5	265.8 ± 13.5	264.4 ± 10.8	264.3 ± 10.3	261.6 ± 9.4	(11)			
	15	269.3 ± 11.8	270.1 ± 11.7	271.9 ± 12.8	269.3 ± 10.2	267.4 ± 9.4	(11)			
	18	277.7 ± 11.0 (3)	267.0 ± 17.1 (3)	292.0 (2)	280.0 ± 9.2 (3)	277.0 ± 16.9 (4)				
	22				283.0 (1)	316.5 (2)				
	25				289.0 (1)	324.5 (2)				
	29					335.0 (1)				

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

Table 14 Body weight of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0	2.5	5	10	20
Number of dams	12	12	12	12	10
Days of pregnancy					
0	279.8 ± 14.5	282.0 ± 12.3	278.8 ± 13.3	278.5 ± 12.2	279.0 ± 17.8
7	316.7 ± 15.3	320.7 ± 16.4	314.4 ± 17.3	315.4 ± 9.4	303.2 ± 17.7 (9)
14	352.7 ± 16.4	360.5 ± 20.3	350.8 ± 20.6	350.4 ± 10.6	331.1 ± 19.2* (9)
21	440.1 ± 25.6	445.3 ± 25.7	435.0 ± 27.3	437.1 ± 23.0	424.8 ± 22.1 (8)

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (*: P<0.05).

Table 15 Body weight of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0		2.5	5	10	20
Number of dams	12		12	12	12	8
Days of lactation	0	326.8 ± 28.7	319.3 ± 14.4	317.4 ± 30.5	321.4 ± 27.9	308.1 ± 16.5
	4	329.6 ± 29.1	344.8 ± 16.6	334.1 ± 19.6	342.7 ± 9.6 (11)	328.6 ± 12.8

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Table 16 Food consumption of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-							
	0		2.5		5		10		20	
Number of females	12		12		12		12		12	
Days of admin- istration	3	15.6 ± 3.0	15.6 ± 2.9		15.0 ± 1.7		15.3 ± 2.4		14.9 ± 2.4	
	6	15.7 ± 2.3	15.8 ± 2.4		15.4 ± 2.0		13.8 ± 2.6		15.0 ± 2.4	(11)
	10	15.3 ± 1.9	15.5 ± 2.5		16.0 ± 2.9		15.9 ± 1.4		16.4 ± 2.3	(11)
	13	16.8 ± 2.6	15.3 ± 2.2		17.5 ± 2.4		15.5 ± 2.8		15.3 ± 3.2	(11)

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

Table 17 Food consumption of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-							
	0		2.5		5		10		20	
Number of dams	12		12		12		12		9	
Days of pregnancy										
2	20.4 ±	2.6	20.8 ±	2.7	19.6 ±	1.8	19.8 ±	2.6	18.4 ±	2.4
9	23.3 ±	1.9	24.0 ±	4.0	22.9 ±	2.2	22.2 ±	3.3	19.8 ±	4.1*
16	21.8 ±	1.8	22.3 ±	2.7	20.8 ±	3.1	22.7 ±	2.7	19.2 ±	4.9
21	17.6 ±	2.6	18.2 ±	2.4	15.3 ±	3.1	18.3 ±	3.6	19.6 ±	3.2 (8)

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (*: P<0.05).

Table 18 Food consumption of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0	2.5	5	10	20
Number of dams	12	12	12	11	8
Days of lactation 4	26.4 ± 7.1	26.2 ± 5.4	24.9 ± 5.2	27.9 ± 7.1	29.0 ± 2.9

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 19-1 Necropsy findings of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0	2.5	5	10	20
Number of females	12	12	12	12	9
Findings					
Normal	11	12	11	10	3
Forestomach(mucosa)					
Thickening	0	0	0	1	4
Ulcer	0	0	0	1	3
Spleen					
Large	0	0	1	0	0
Yellow nodule	0	0	1	0	0
Adhesion(to liver and stomach)	0	0	1	0	0
Mammary gland(right submaxilla)					
Tumor	1	0	0	0	0

Table 19-2 Necropsy findings of dead female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0	2.5	5	10	20
Number of females	0	0	0	0	3
Findings					
Normal	-	-	-	-	2
Forestomach(mucosa)					
Ulcer	-	-	-	-	1

Table 20 Organ weight of dams (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-									
	0		2.5		5		10		20			
Number of dams	12		12		12		11		8			
Body weight (g)	329.6 ±	29.1	344.8 ±	16.6	334.1 ±	19.6	342.7 ±	9.6	328.6 ±	12.8		
Brain (g)	1.954 ±	0.086	1.967 ±	0.064	1.946 ±	0.059	1.912 ±	0.038	1.965 ±	0.097		
	(g%) 0.594 ±	0.035	(g%) 0.571 ±	0.027	(g%) 0.585 ±	0.030	(g%) 0.558 ±	0.017*	(g%) 0.599 ±	0.041		
Pituitary (mg)	22.68 ±	3.84	21.59 ±	2.16	21.04 ±	2.30	21.18 ±	2.18	22.71 ±	3.62		
	(mg%) 6.86 ±	0.87	(mg%) 6.28 ±	0.54	(mg%) 6.30 ±	0.75	(mg%) 6.20 ±	0.73	(mg%) 6.90 ±	0.99		
Thyroids (mg)	21.73 ±	4.27	17.73 ±	4.53	19.50 ±	3.48	18.19 ±	4.42	20.66 ±	3.61		
	(mg%) 6.59 ±	1.12	(mg%) 5.16 ±	1.34*	(mg%) 5.87 ±	1.06	(mg%) 5.31 ±	1.23*	(mg%) 6.30 ±	1.20		
Thymus (mg)	176.44 ±	64.13	195.48 ±	48.53	185.05 ±	47.49	223.83 ±	58.59	181.98 ±	64.44		
	(mg%) 52.68 ±	16.41	(mg%) 56.68 ±	13.27	(mg%) 55.13 ±	12.00	(mg%) 65.20 ±	16.20	(mg%) 55.39 ±	19.42		
Heart (g)	1.073 ±	0.118	1.059 ±	0.073	1.026 ±	0.082	1.084 ±	0.085	1.033 ±	0.076		
	(g%) 0.326 ±	0.025	(g%) 0.306 ±	0.021	(g%) 0.308 ±	0.020	(g%) 0.315 ±	0.019	(g%) 0.314 ±	0.033		
Liver (g)	13.156 ±	1.764	14.248 ±	0.739	13.657 ±	1.737	13.525 ±	1.635	13.674 ±	1.468		
	(g%) 3.984 ±	0.347	(g%) 4.139 ±	0.284	(g%) 4.091 ±	0.479	(g%) 3.945 ±	0.446	(g%) 4.164 ±	0.435		
Spleen (g)	0.705 ±	0.150	0.654 ±	0.092	0.793 ±	0.335	0.724 ±	0.114	0.709 ±	0.067		
	(g%) 0.214 ±	0.044	(g%) 0.190 ±	0.027	(g%) 0.239 ±	0.106	(g%) 0.212 ±	0.033	(g%) 0.216 ±	0.030		
Kidneys (g)	1.988 ±	0.173	1.930 ±	0.113	1.953 ±	0.135	1.913 ±	0.141	1.910 ±	0.083		
	(g%) 0.606 ±	0.055	(g%) 0.559 ±	0.050	(g%) 0.585 ±	0.037	(g%) 0.556 ±	0.036	(g%) 0.583 ±	0.032		
Adrenals (mg)	78.22 ±	11.58	77.98 ±	7.98	76.83 ±	14.62	77.42 ±	7.57	76.65 ±	10.63		
	(mg%) 23.83 ±	3.71	(mg%) 22.70 ±	2.93	(mg%) 23.10 ±	4.82	(mg%) 22.58 ±	1.97	(mg%) 23.29 ±	2.82		
Ovaries (mg)	122.43 ±	27.39	115.63 ±	14.86	118.53 ±	15.08	107.44 ±	11.56	119.96 ±	17.99		
	(mg%) 37.00 ±	6.57	(mg%) 33.66 ±	4.91	(mg%) 35.57 ±	4.73	(mg%) 31.33 ±	3.01	(mg%) 36.59 ±	5.90		

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (*: P<0.05).

Table 21 Histopathological findings of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control						1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-																									
	0						2.5						5						10						20							
Incidence & Grade	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+		
Findings																																
Heart	[12]						[12]						[12]						[12]						[9]							
Cellular infiltration, histiocyte, focal	12	0					12	0					12	0					12	0					8	1	1	0	0	0		
Liver	[12]						[0]						[0]						[0]						[9]							
Hematopoiesis, extramedullary	11	1	1	0	0	0													8	1	1	0	0	0								
Stomach	[12]						[12]						[12]						[12]						[9]							
Hyperkeratosis, forestomach	12	0					7	5	2	3	0	0	8	4	1	3	0	0	2	10	0	8	2	0	**	0	9	0	1	4	4	**#
Hyperplasia, epithelium, forestomach	12	0					7	5	2	3	0	0	8	4	0	2	2	0	2	10	0	5	5	0	**	0	9	0	1	1	7	**#
Cellular infiltration, inflammatory cell, mucosa, forestomach	12	0					11	1	1	0	0	0	9	3	2	1	0	0	3	9	2	5	2	0	**	1	8	1	3	2	2	**#
Ulcer, forestomach	11	1	1	0	0	0	12	0					11	1	1	0	0	0	12	0					6	3	3	0	0	0		
Thymus	[12]						[0]						[0]						[0]						[9]							
Atrophy, cortex	12	0																	8	1	1	0	0	0								
Spleen	[12]						[0]						[1]						[0]						[9]							
Hematopoiesis, extramedullary	1	11	1	5	5	0							1	0					1	8	2	4	2	0								
Necrosis, massive	12	0											0	1	0	0	1	0	9	0												
Urinary bladder	[12]						[0]						[0]						[0]						[9]							
Edema, mucosa	12	0																	8	1	0	1	0	0								
Thyroid	[12]						[0]						[0]						[0]						[9]							
Ectopic thymic tissue	11	1	1	0	0	0													9	0												
Mammary gland	[12]						[0]						[0]						[0]						[9]							
Adenocarcinoma, submaxillary, right	11	1	0	1*	0	0													9	0												

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

N: No abnormality detected.

A: Abnormality detected.

[]: Number of females examined.

No remarkable changes were seen in lung, trachea, pancreas, salivary gland(sublingual and submandibular), esophagus, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, lymph node(submandibular and mesenteric), ovary, uterus, vagina, kidney, pituitary, adrenal, parathyroid, brain(cerebrum, cerebellum and medulla oblongata), spinal cord, sciatic nerve, eyeball, Harderian gland and bone marrow(sternum and femur).

*: mean existence.

Examined only heart and stomach in the 2.5,5,10 mg/kg group.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Significantly different by dose response test (##: P<0.01).

Table 22 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0	2.5	5	10	20
Number of females	12	12	12	12	11
Number of estrous cases before mating (14 days) Mean±S.D.	3.6 ± 0.5	3.3 ± 0.5	3.4 ± 0.5	3.8 ± 0.5	3.4 ± 0.7
Number of pairs	12	12	12	12	11
Number of pairs with successful copulation	12	12	12	12	10
Copulation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0	90.9
Number of conceiving days Mean±S.D.	2.8 ± 0.9	2.5 ± 1.2	2.4 ± 1.1	3.4 ± 2.8	3.4 ± 3.2
Conceiving days 1-5	12	12	12	11	9
Conceiving days ≥6	0	0	0	1	1
Number of pregnant females	12	12	12	12	9
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of dead pregnant females	0	0	0	0	1
Number of live pregnant females at delivery	12	12	12	12	8
Number of pregnant females with live pups	12	12	12	11	8

a): (Number of pairs with successful copulation / number of pairs)×100.

b): (Number of pregnant females / number of pairs with successful copulation)×100.

Table 23 Observation of pups (F1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0	2.5	5	10	20
Number of dams	12	12	12	12	8
Length of gestation (days)	22.17 ± 0.39	22.42 ± 0.51	22.33 ± 0.49	22.50 ± 0.67	22.38 ± 0.52
Pregnancy days ≤ 21	0	0	0	0	0
Pregnancy days = 22	10	7	8	7	5
Pregnancy days ≥ 23	2	5	4	5	3
Corpora lutea	18.0 ± 1.7	18.5 ± 2.4	18.0 ± 2.1	16.4 ± 2.4	19.4 ± 2.6
Implantation scars	16.3 ± 1.2	16.3 ± 1.7	16.7 ± 2.4	14.6 ± 3.3	16.4 ± 1.3
Implantation index (%) ^{a)}	90.6 ± 6.2	88.6 ± 7.5	92.4 ± 6.8	88.0 ± 15.3	85.4 ± 10.6
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	91.7	100.0
Pups born	14.7 ± 2.3	15.6 ± 1.2	15.3 ± 3.1	14.0 ± 3.3	15.0 ± 2.3
Stillbirths	0.3 ± 0.6	0.9 ± 1.4	0.8 ± 1.7	1.4 ± 3.4	0.1 ± 0.4
Live pups born	14.4 ± 2.7	14.7 ± 1.4	14.6 ± 3.3	12.6 ± 5.1	14.9 ± 2.4
Sex ratio at birth ^{c)}	1.39 ± 0.81	0.94 ± 0.43	0.95 ± 0.45	0.88 ± 0.28	1.69 ± 0.74
(Total male/total female)	102 / 71	81 / 95	82 / 93	70 / 81	72 / 47
Delivery index (%) ^{d)}	90.1 ± 11.2	95.7 ± 4.9	91.3 ± 8.9	96.1 ± 4.6	91.3 ± 7.0
Birth index (%) ^{e)}	88.4 ± 13.9	90.5 ± 11.2	86.8 ± 10.8	86.3 ± 27.8	90.4 ± 8.0
Live birth index (%) ^{f)}	97.8 ± 5.9	94.5 ± 8.5	95.4 ± 10.0	88.9 ± 28.6	99.0 ± 2.8
Live pups on day 4 of lactation	14.2 ± 2.8	13.8 ± 2.9	14.3 ± 3.3	13.6 ± 3.3	14.9 ± 2.4
Sex ratio on day 4 of lactation ^{c)}	1.34 ± 0.80	0.88 ± 0.49	0.96 ± 0.45	0.90 ± 0.32	1.69 ± 0.74
(Total male/total female)	99 / 71	74 / 92	81 / 91	70 / 80	72 / 47
Viability index (%) ^{g)}	97.9 ± 4.0	93.3 ± 14.3	98.3 ± 3.1	99.5 ± 1.8	100.0 ± 0.0
External anomalies (%) ^{h)}	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 2.8
Anury (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 2.8

Each value shows mean ± S.D. per dam.

Figures in parentheses indicate number of dams.

a): (Number of implantation scars / number of corpora lutea)×100.

c): Number of male pups / number of female pups.

e): (Number of live pups born / number of implantation scars)×100.

g): (Number of live pups on day 4 / number of live pups born)×100.

b): (Number of dams with live pups / number of pregnant dams)×100.

d): (Number of pups born / number of implantation scars)×100.

f): (Number of live pups born / number of pups born)×100.

h): (Number of pups with external anomalies / number of live pups)×100.

Table 24 Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0	2.5	5	10	20
Number of dams	12	12	12	11	8
Male weight					
Days of lactation					
0	6.48 ± 0.56	6.62 ± 0.66	6.36 ± 0.73	6.92 ± 0.64	6.51 ± 0.54
4	10.48 ± 1.63	11.18 ± 1.32 (11)	10.69 ± 1.79	11.56 ± 1.81	10.40 ± 1.27
Female weight					
Days of lactation					
0	6.14 ± 0.50 (11)	6.27 ± 0.56	6.02 ± 0.60	6.54 ± 0.74	6.13 ± 0.42
4	9.85 ± 1.51 (11)	10.37 ± 1.11	10.20 ± 1.58	11.22 ± 2.11	10.05 ± 1.04
Mean pups weight					
Days of lactation					
0	6.36 ± 0.51	6.44 ± 0.59	6.18 ± 0.65	6.71 ± 0.67	6.38 ± 0.47
4	10.28 ± 1.54	10.69 ± 1.18	10.43 ± 1.67	11.37 ± 1.96	10.28 ± 1.18
Litter weight					
Days of lactation					
0	90.95 ± 14.80	94.48 ± 12.35	88.49 ± 14.12	90.30 ± 17.93	94.03 ± 11.08
4	143.58 ± 28.25	146.62 ± 29.48	144.56 ± 16.54	149.91 ± 26.47	150.60 ± 11.95

Each value shows mean (g) ± S.D. per dam.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Table 25 Necropsy findings of pups (F1) on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-			
	0	2.5	5	10	20
Number of males	99	74	81	70	72
Findings					
Normal	99	74	81	70	72
Number of females	71	92	91	80	47
Findings					
Normal	71	92	91	80	46
Tail					
Anury	0	0	0	0	1

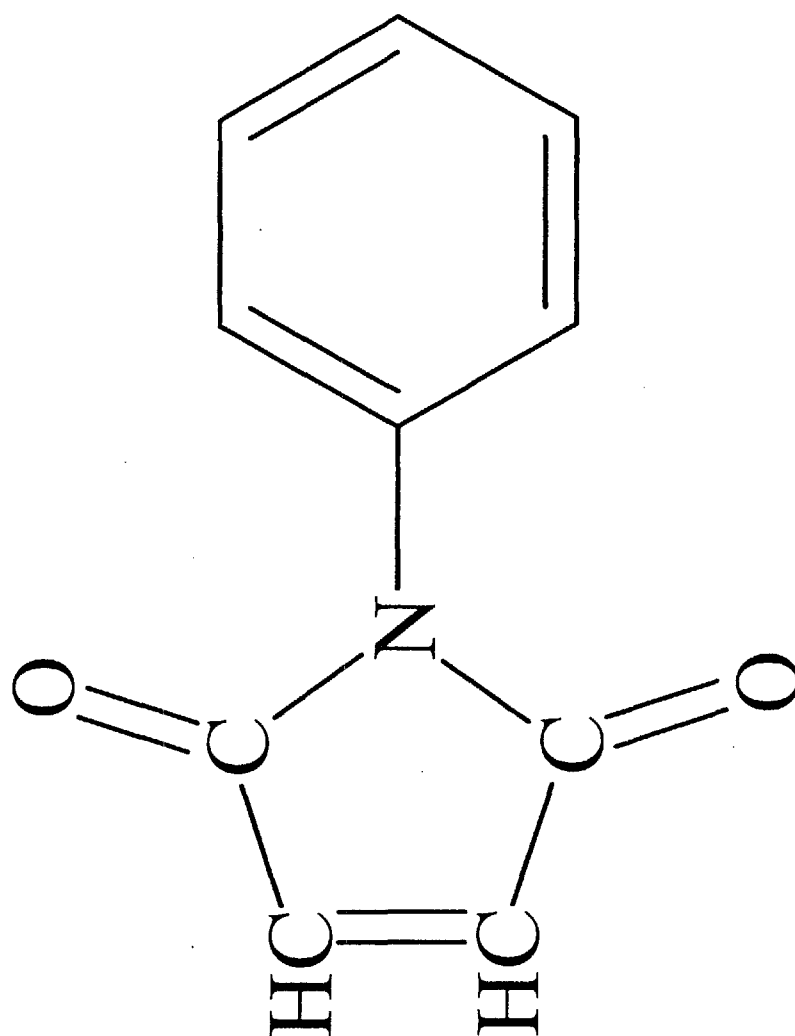


Fig. 1 Chemical structure of 1H-pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-

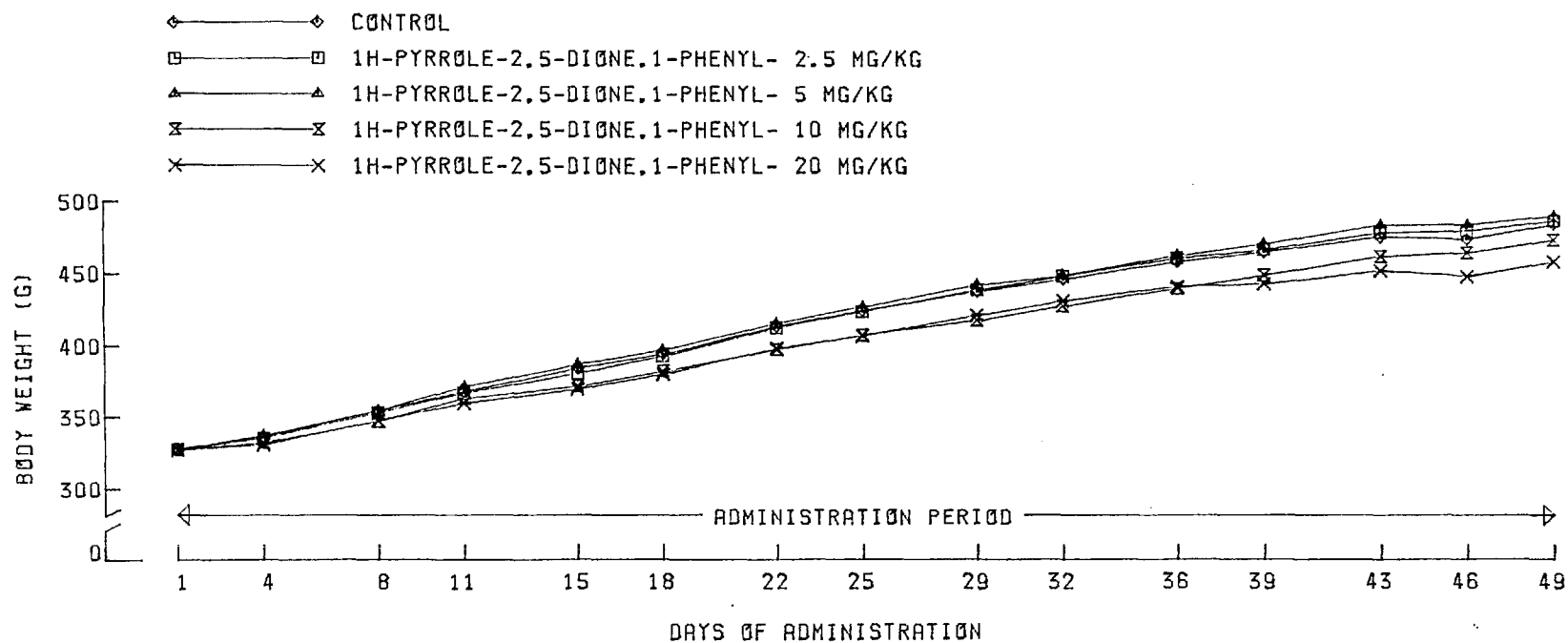


Fig. 2 Body weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

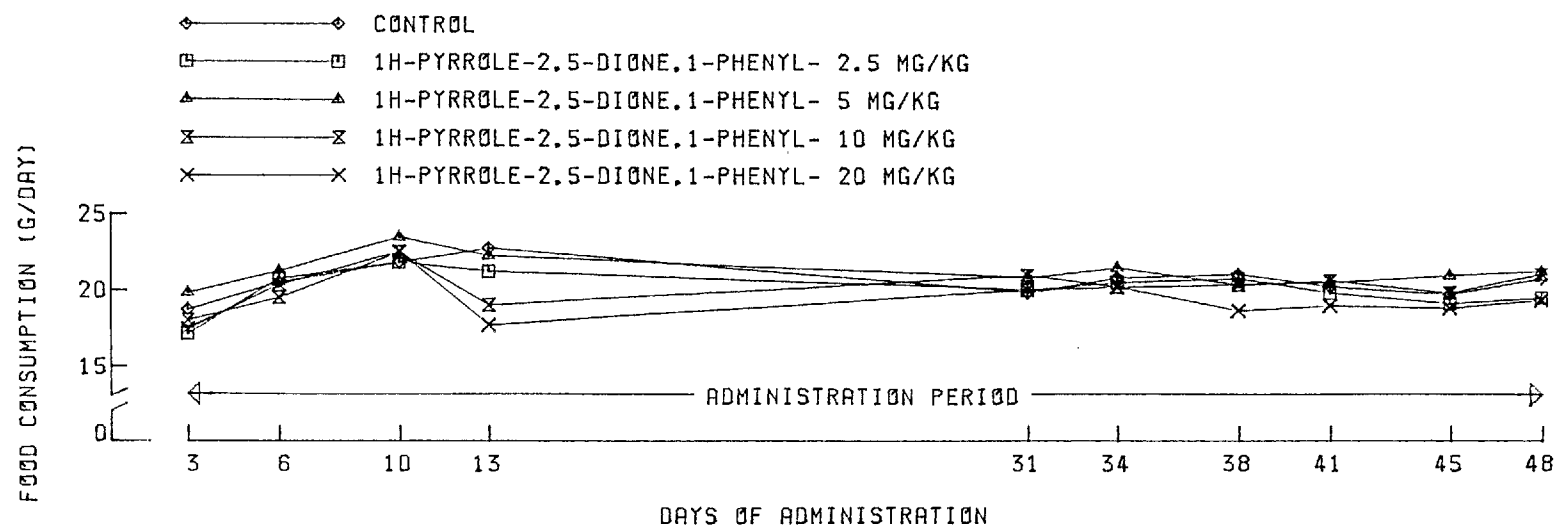


Fig. 3 Food consumption of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

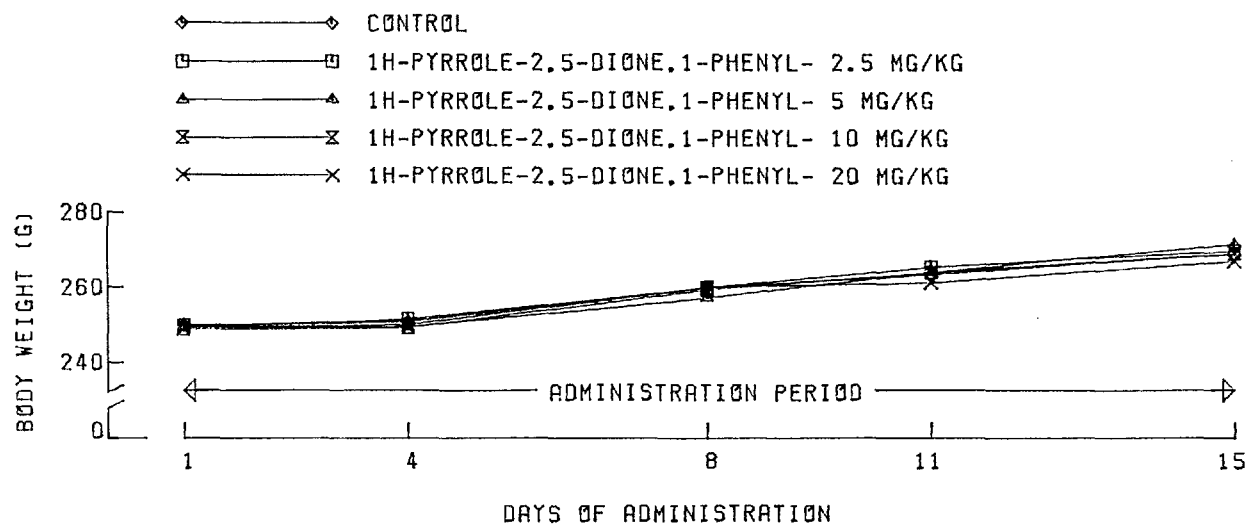


Fig. 4 Body weight of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

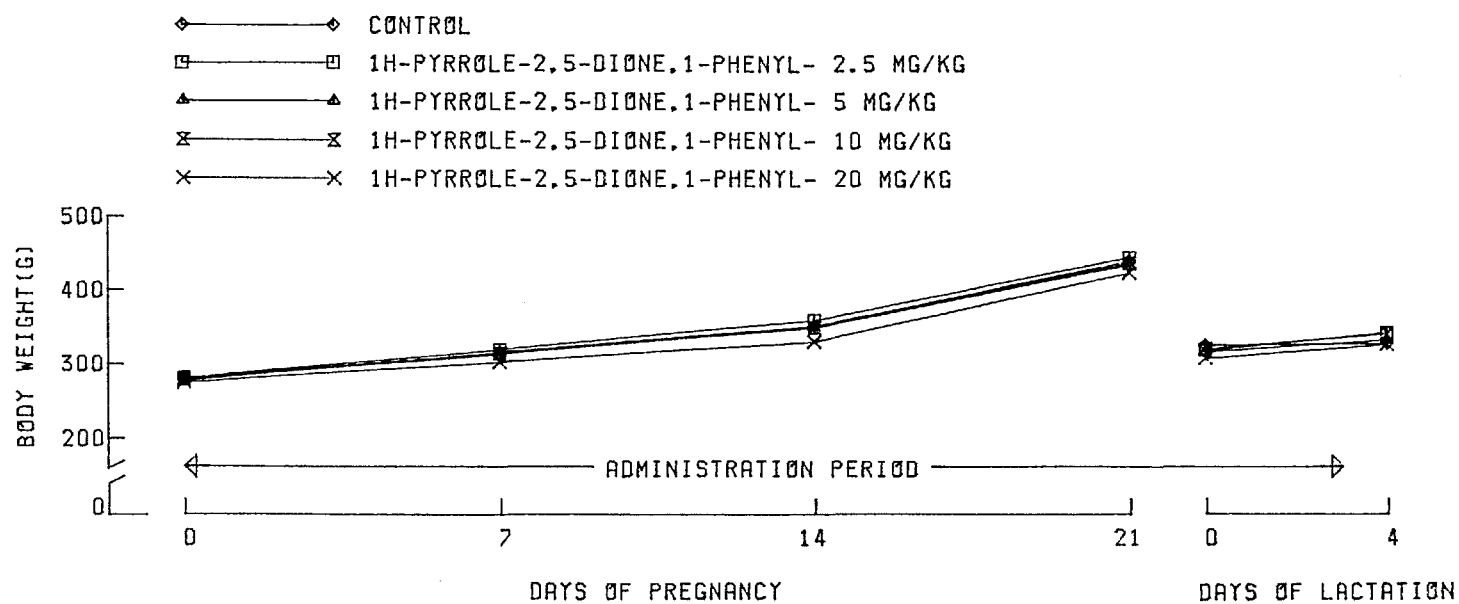


Fig. 5 Body weight of dams (P) during pregnancy and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

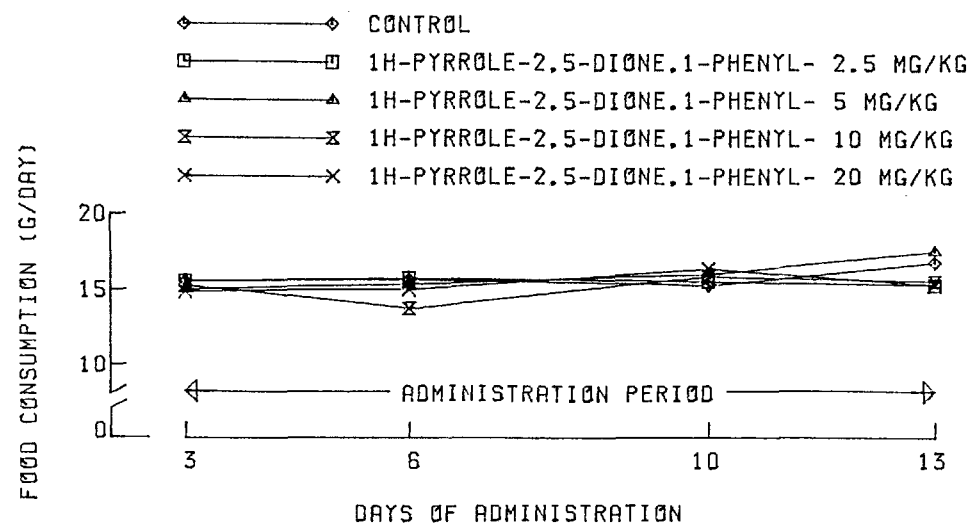


Fig. 6 Food consumption of female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

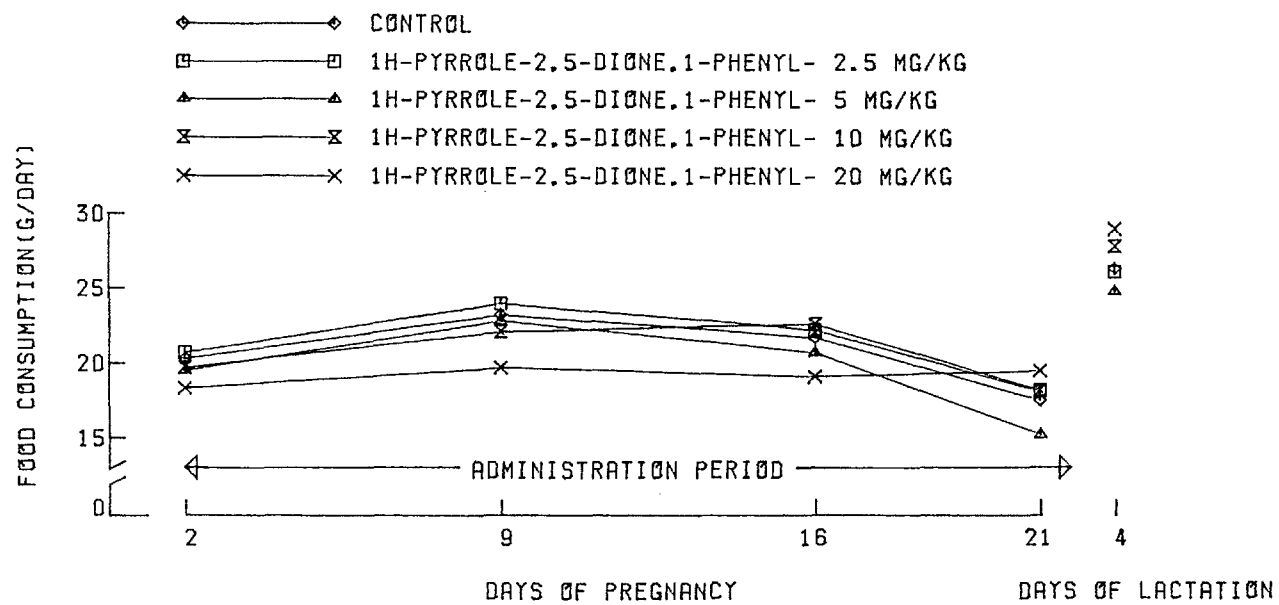


Fig. 7 Food consumption of dams (P) during pregnancy and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration

◇ — ◇ CONTROL
 □ — □ 1H-PYRROLE-2,5-DIONE,1-PHENYL- 2.5 MG/KG
 ▲ — ▲ 1H-PYRROLE-2,5-DIONE,1-PHENYL- 5 MG/KG
 ✕ — ✕ 1H-PYRROLE-2,5-DIONE,1-PHENYL- 10 MG/KG
 × — × 1H-PYRROLE-2,5-DIONE,1-PHENYL- 20 MG/KG

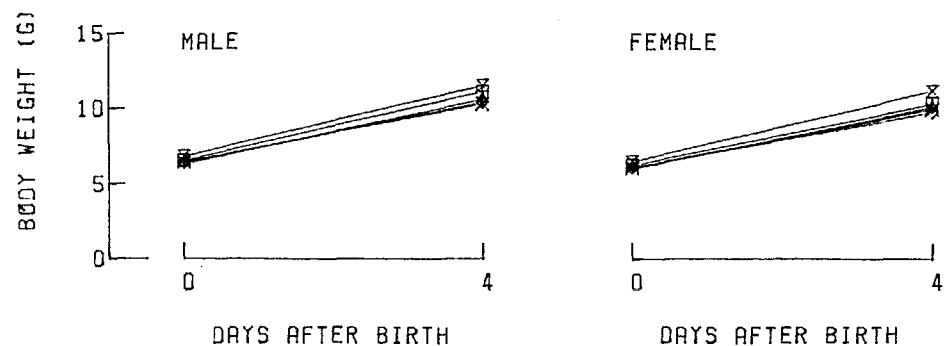


Fig. 8 Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1H-pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- by oral administration