



*N*-tert-ブチル-2-ベンゾチアゾール  
スルフェンアミ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

厚生省 生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦 野 研 究 所

## 【 目 次 】

|                              | 頁  |
|------------------------------|----|
| 要 約 .....                    | 1  |
| 緒 言 .....                    | 4  |
| 試験材料および方法 .....              | 5  |
| 1. 被験物質 .....                | 5  |
| 2. 使用動物および飼育条件 .....         | 5  |
| 3. 群分け法 .....                | 6  |
| 4. 動物の個体識別法 .....            | 6  |
| 5. 投与量、群構成、投与期間および投与方法 ..... | 6  |
| 6. 観察方法 .....                | 7  |
| 7. 統計解析 .....                | 10 |
| 結 果 .....                    | 12 |
| I. 反復投与毒性（親動物所見） .....       | 12 |
| 1. 一般状態 .....                | 12 |
| 2. 体重 .....                  | 12 |
| 3. 摂餌量 .....                 | 13 |
| 4. 解剖時検査所見 .....             | 13 |
| II. 生殖発生毒性 .....             | 17 |
| 1. 生殖学的検査所見 .....            | 17 |
| 2. 出生児所見 .....               | 18 |
| 考 察 .....                    | 19 |
| 文 献 .....                    | 22 |

Figures     (Figure 1 ~ Figure 4)

Tables      (Table 1 ~ Table 27)

## 【 要 約 】

OECD 既存化学物質安全性スクリーニング試験の一環として、*N*-tert-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド（以下BBTSA）の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行った。すなわち、BBTSAの0（溶媒対照）、40、200 および 1000 mg/kg を Sprague-Dawley 系（Crj:CD）ラットの雌雄（各13匹／群）に、交配前2週間および交配期間2週間経口投与し、さらに雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して、親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

### I. 反復投与毒性（親動物所見）

#### 1. 雄動物

200 mg/kg 以上の投与量のBBTSAは、投与後一過性の流涎を惹起し、1000 mg/kg 投与は、摂餌量および体重増加を抑制した。また、BBTSAを42回反復投与することにより、以下の変化が認められた。

すべてのBBTSA投与群において、腎臓に eosinophilic body を認める動物の頻度が増加し、1000 mg/kg 投与群では病変の程度も増強され、重量およびその比体重値が増加した。これにより、BBTSAの無影響量は本試験からは求められなかった。また、対照群に認められた、腎臓のリンパ球浸潤がBBTSA各投与群には認められず、その頻度が有意に減少した。

肝臓では、200 mg/kg 以上の投与群において、小葉中心部の肝細胞に軽度な肥大が認められ、1000 mg/kg 投与群ではその程度が増強されたが、BBTSAの投与量に関連した肝臓重量比体重値の増加は、1000 mg/kg 投与群にのみ認められた。また、1000 mg/kg の投与により門脈周囲性の肝細胞脂肪化の減弱が認められた。

200 mg/kg 以上の投与群において、総ビリルビン濃度が僅かに増加し、脾臓におけるペルリンブルー染色陽性の色素沈着が用量に依存して増強された。さらに、1000 mg/kg 投与群では、血色素量およびヘマトクリット値も僅かに減少し、溶血性貧血が惹起された。この他、1000mg/kgの投与群では総コレステロール濃度が軽度増加した。

その他の器官にBBTSAの影響を示唆する変化は認められなかった。

## 2. 雌動物

200 mg/kg 以上の投与量のBBTSAは、投与後一過性の流産を惹起し、1000 mg/kg の投与は、交配前および妊娠期の摂餌量を抑制し、妊娠初期の体重増加を軽度抑制した。また、BBTSAを哺育4日まで反復投与することにより以下の変化が認められた。

200 mg/kg 以上の投与群の腎臓には、近位尿細管に軽度な空胞変性が認められ、腎臓重量比体重値が軽度に増加した。

200 mg/kg 以上の投与群の肝臓では、小葉中心部肝細胞が軽度に肥大するものが増加し、1000 mg/kg 投与群では肝臓重量比体重値が増加した。

1000 mg/kg 投与群の脾臓には、褐色色素の沈着が増強する傾向が認められたが、ベルリンブルー染色陽性色素の沈着は対照群と同程度であったことから、雌動物にはBBTSA投与による溶血はないものと判断された。

その他の器官にBBTSAの影響を示唆する変化は認められず、40 mg/kg の投与による影響は認められなかった。

## II. 生殖発生毒性

### 1. 生殖学的検査所見

1000 mg/kg までのBBTSAを投与しても、交尾および排卵に影響は認められなかった。対照群と比較して有意差はなかったものの、40 mg/kg および1000 mg/kg 投与群の受胎率が低値を示した。200 mg/kg 投与群の動物は全例が受胎したことから、40 mg/kg 投与群の変化は偶発的変化であると判断される。1000 mg/kg 投与群についてはBBTSA投与との関連性の有無は不明であることから、受胎に関する無影響量は 200 mg/kg であると結論される。BBTSA投与に起因する分娩異常および哺育状態の異常はいずれの投与群にも認められなかった。

### 2. 出生児所見

出生児の生存性、性比および体重にBBTSA投与の影響は認められず、BBTSA投与に起因した形態異常も観察されなかった。

## III. 評価

以上の試験成績から、本試験条件下では、BBTSAの反復投与毒性に関する無影響量は、

雄では 40 mg/kg/day を下回る量であり、雌では 40 mg/kg/day であると結論される。また、生殖・発生毒性に関する無影響量は、雌雄ともに 200 mg/kg/day であると結論される。

## 【 緒 言 】

BBTSAは、2原子のイオウを含有するヘテロ環系化合物である。ゴム製造過程における硬化促進剤として広く使用されているため、ゴム加工に携わる労働者にとって職業的に暴露される機会の多い化学物質である<sup>1)</sup>。しかし、その毒性については、ラットに対するLD<sub>50</sub>値（経口投与では6310 mg/kg 以上、経皮投与では7940 mg/kg 以上）およびウサギの眼刺激試験成績（軽度な刺激性）<sup>2)</sup>が報告されている程度で、中および長期に亘る反復投与毒性については明らかにされていない。

生殖発生毒性に関しては、鶏胚におけるLD<sub>50</sub>値と胚死亡および奇形の発現に関するED<sub>50</sub>値がそれぞれ0.36  $\mu$ mole/egg および0.30  $\mu$ mole/egg と報告されているが<sup>3)</sup>、哺乳動物を用いた評価は行われていない。そこで、今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環としてBBTSAの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（以下、併合試験）を行い、雌雄ラットに及ぼす反復投与毒性ならびに生殖・発生毒性について検討したのでその結果を報告する。

## 【試験材料および方法】

### 1. 被験物質

*N*-tert-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド (BBTSAと略記) [CAS No.: 95-31-8; 分子式:  $C_{11}H_{14}N_2S_2$ ; 分子量: 238.37; 英名: *N*-tert-buthyl-2-benzothiazolesulfenamide、融点、104℃] は、帯黄灰白色ペレット状の、ヘテロ環系化合物である。

併合試験に使用したBBTSA [ロット番号: 純度: 96.4% (主な不純物: ジベンゾチアジルスルフィド、0.99%) (Annex 1)] は、使用時まで密封、冷蔵条件下で保管し、5%アラビアゴム [日本薬局方アラビアゴム末: 宮澤薬品(株)、ロット番号: JD03; 日本薬局方注射用水: 三亜製薬(株)、製造番号: DH004] に懸濁して、いずれの用量においても1回の投与液量が5 ml/kg 体重になるように含量を調整した。調製液は、冷蔵、遮光条件下で保管し、調製後7日以内に投与した。調製液中の被験物質は、冷蔵、遮光条件下で少なくとも7日間安定であることが、併合試験に先立って実施された「*N*-tert-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合予備試験 (14日間反復投与毒性試験、以下、予備試験)」において確認されている (Annex 2)。また、併合試験において調製された投与検体を振盪攪拌した後は、ほぼ所定量のBBTSAが均一に含有されていたことを確認した (Annexes 3、4)。

### 2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄ともに7週齢で購入した日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産の Sprague-Dawley 系ラット (Crj:CD、SPF) を使用した。購入した動物は、入荷後7日間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、全例の一般状態に異常が認められなかったため、これを試験に供した。動物の入荷、検疫ならびに群分け状況は、Annex 5 に示した。

各動物は、基準温湿度各 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、および50~65%、換気回数約15回/時、照明12時間 (午前7時~午後7時) に制御された飼育室で、金属製金網床ケージ (22×27×19cm、日本ケージ(株)) に個別に収容して飼育し、固型飼料 (CE-2、日本クレア(株)) および水道水を自由に摂取させた。妊娠14日 (精子観察日=妊娠0日) 以後の母動物は、ラット用繁殖ケージ (35×40×18cm、日本クレア(株)) に収容し、床敷として紙パルプ製チップ (ALPHA-

dri、加商(株)を適宜供給した。

供給した飼料、水および床敷には試験に支障を来す可能性の考えられる混入物はなかった。

### 3. 群分け法

雌雄とも初回投与日（投与1日）の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けし、1群につき各13匹を用意した。

### 4. 動物の個体識別法

すべての親動物は、尾にフェルトペンで群および個体番号を記して個体識別した。各飼育ケージには、個体番号等の必要事項を記入した、群ごとに色彩の異なるカードを掛けて個体識別の補助とした。なお、出生児は、個体を識別しなかった。

### 5. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

先に実施した予備試験において、250 mg/kg 以上のBBTSAは雌に対して、また、500 mg/kg 以上のBBTSAは雄に対して変化を惹起したが、最高用量の 1000 mg/kg を投与しても瀕死あるいは死亡に至る動物が認められなかったので、併合試験においてもこれを最高用量とし、以下公比5で減じ、中間用量には 200 mg/kg、最低用量には 40 mg/kg を設定した。対照群のラットには、BBTSAの媒体とした5%アラビアゴムをBBTSA投与群と同一条件で投与した。以下に群構成を示す。

| 群番号 | 被験物質  | 投与量<br>(mg/kg) | 匹数（動物番号）         |                  |
|-----|-------|----------------|------------------|------------------|
|     |       |                | 雄                | 雌                |
| 1   | 溶媒対照  | 0              | 13 (MX01001-013) | 13 (FB01001-013) |
| 2   | BBTSA | 40             | 13 (MX02001-013) | 13 (FB02001-013) |
| 3   | BBTSA | 200            | 13 (MX03001-013) | 13 (FB03001-013) |
| 4   | BBTSA | 1000           | 13 (MX04001-013) | 13 (FB04001-013) |

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後14日間の連続42日間、また、雌に対しては交配前14日間と最長14日間の交配期間中（交尾成立まで）ならびに交尾成立雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日（分娩日＝哺育0日）まで毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した。毎日の投与は、原則として一



定時刻の間（通常13時～15時）に行い、各動物の投与液量は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重をもとに、また、交尾成立後の雌については妊娠0日（交尾確認日）の体重をもとにそれぞれ算出した。

## 6. 観察方法

### 1) 親動物

#### A. 一般状態

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日観察した。

#### B. 体重

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週1回〔雄：投与1、8、15、22、29、36、42日、雌：投与1、8、15日〕および剖検日に測定した。投与29日までに交尾が成立しなかった雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾成立雌では、妊娠0、7、14、20日に、さらに、分娩した雌では、哺育0および4日の体重を測定した。

#### C. 摂餌量

雌雄とも、全例について体重測定日と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算出した。2週間の交配期間中は摂餌量を測定しなかった。交尾成立雌では、妊娠0～7、7～14、14～20日の、さらに、分娩した雌では、哺育0～4日の摂餌量を測定した。

#### D. 交配

交配は、投与15日の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾成立の確認は、毎朝、腔栓および腔垢中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率〔（交尾確認動物数／交配動物数）×100〕、受胎率〔（妊娠動物数／交尾確認動物数）×100〕、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

#### E. 分娩・哺育状態

各群とも交尾成立雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態は直接観察が可能であったものについてのみ行った。分娩後は全例について哺育状態を観察した。

#### F. 分娩確認

分娩の確認は、午前9時～11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認

した動物について、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間（妊娠0日から分娩日までの日数）を算定し、出産率〔（生児出産雌数／妊娠動物数）×100〕を各群について求めた。

## G. 最終検査

### a) 雄動物

#### i. 剖検、器官重量測定および病理組織学的検査

最終投与日の投与終了後から絶食を開始し、翌日にペントバルビタール麻酔下で放血・致死させて剖検した。その際、全例について肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、精巣および精巣上体の重量を測定した。これらの器官のうち、精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存し、その他の器官および脳、心臓、副腎、膀胱は、10%ホルマリンに固定して保存した。これらの器官は高用量群および対照群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学的検査を行った。肝臓、腎臓および脾臓は、高用量群に異常が認められたので、その他の投与群についても検査を実施した。また、腎臓については、対照群および1000 mg/kg 投与群の一部の動物についてPeriodic acid shiff (PAS) 染色を行い、脾臓については、全例についてベルリンブルー染色を行った。なお、脾臓については、予備試験において雌に重量の減少が認められたため、雄についても重量測定と病理組織学的検査を実施した。

#### ii. 血液学的検査

全例について、剖検に先立ち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTAを抗凝固剤として採血し、次の項目について検査した。

| 項 目               | 測 定 法                          | 使 用 機 器                                           |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------|
| 赤血球数 (RBC)        | 自動 (電気抵抗法)                     | Coulter Counter Model S-PLUS IV (コルター・エレクトロニクス 社) |
| 白血球数 (WBC)        | 〃 ( 〃 )                        | 〃                                                 |
| 血色素量 (Hb)         | 〃 (吸光度法)                       | 〃                                                 |
| 平均赤血球容積 (MCV)     | 〃 (電気抵抗法)                      | 〃                                                 |
| ヘマトクリット値 (Ht)     | 計算 (0.001×RBC×MCV)             |                                                   |
| 平均赤血球血色素量 (MCH)   | 〃 (1000×Hb/RBC)                |                                                   |
| 平均赤血球血色素濃度 (MCHC) | 〃 (100×Hb/Ht)                  |                                                   |
| 血小板数              | 自動 (電気抵抗法)                     | 〃                                                 |
| 白血球分類             | 視算 (静脈血塗抹標本, Wright-Giemsa 染色) | 光学顕微鏡                                             |

#### ii. 血液生化学的検査

全例について、血液学的検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血

し、それぞれ血漿を分離して次の項目について検査を行った。なお、GPT活性については、予備試験の結果に基づいて実施した、「BBTSAのGPT活性測定系に及ぼす影響の検討結果」から、血清中に存在するBBTSAがGPT活性の測定系を干渉することが明らかとなったため、測定をとりやめた。

| 項 目                     | 測 定 法                                  | 使 用 機 器                            |
|-------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|
| 総蛋白濃度                   | ビウレット法                                 | 遠心方式生化学自動分析装置<br>COBAS- FARA (ロシュ) |
| アルブミン濃度                 | BCG法                                   | 〃                                  |
| 総コレステロール濃度              | COD・DAOS法                              | 〃                                  |
| ブドウ糖濃度                  | グルコキナーゼG6PDH 法                         | 〃                                  |
| 尿素窒素濃度 (BUN)            | ウレアーゼG1. DH 法                          | 〃                                  |
| クレアチニン濃度                | Jaffe 法                                | 〃                                  |
| アルカリフォスファターゼ活性<br>(ALP) | p-ニトロフェリル酸基質法                          | 〃                                  |
| GOT活性                   | SSCC法                                  | 〃                                  |
| 総ビリルビン濃度                | ビリルビン「ロシュ」キット S シリーズ                   | 〃                                  |
| カルシウム濃度                 | OCPC法                                  | 〃                                  |
| ナトリウム濃度                 | イオン電極法                                 | 全自動電解質分析装置 EA05<br>(A&T)           |
| カリウム濃度                  | イオン電極法                                 | 〃                                  |
| 塩素濃度                    | イオン電極法                                 | 〃                                  |
| 無機リン濃度                  | モリブデン酸直接法                              | 遠心方式生化学自動分析装置<br>COBAS- FARA (ロシュ) |
| $\gamma$ -GTP活性         | $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロリド<br>基質法 | 〃                                  |
| A/G比                    |                                        | 計算                                 |

#### b) 雌動物

交尾不成立雌は交配期間終了日に、交尾したが分娩しない雌は妊娠25日相当日に、それぞれ致死量のペントバルビタールを投与後に放血・致死させ、剖検した。また、分娩した雌は哺育4日に同様にして剖検した。妊・不妊のいずれの例においても卵巣および子宮を摘出し、子宮については Salewski 法<sup>4)</sup>を応用して着床痕を染色して着床数を確認し、着床痕の認められた動物を妊娠例とした。卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えブアン液に固定して保存した。不妊例および交尾不成立例の卵巣については、病理組織学的検査を行った。また、肝臓、腎臓、脾臓および胸腺の重量を全例について測定した。これらの器官および脳、心臓、副腎、子宮、膀胱は10%ホルマリンに固定して保存した。これらの器官は高用量群および対照群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学的検査を行った。また、脾臓については、全例についてベルリンブルー染色を行った。肝臓、腎臓および脾臓は、雄動物の全群について検査したので、雌についても全群の動物について検査した。なお、脾臓の重量測定および病理組織

学的検査は、予備試験において重量変化が認められたため実施した。

## 2) 出生児

### A. 産児数の確認

哺育0日に産児数（生存児＋死亡児）を調べ、分娩率 $[(\text{産児数}/\text{着床痕数}) \times 100]$ および生児出産率 $[(\text{出產生児数}/\text{着床痕数}) \times 100]$ を求めた。また、産児の外表異常の有無および性別を調べ、生存児の性比 $[(\text{雄の生児数}/\text{出產生児数}) \times 100]$ を算出した。

### B. 死亡児数の確認

死亡児数を毎日調べ、出生率 $[(\text{生児数}/\text{産児数}) \times 100]$ および新生児生存率 $[(\text{哺育4日の生児数}/\text{哺育0日の生児数}) \times 100]$ を求めた。死亡児は剖検し、胸腔および腹腔内の器官を除去した後、エタノールに固定して保存した。

### C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重（litter 重量）を測定し、 $[\text{litter 重量}/\text{測定児数}]$ を各腹について求めた。

### D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させ、剖検した。胸腔および腹腔内の器官は、一括して摘出し、一腹ごとに10%ホルマリンに固定して保存した。カーカスは、一腹ごとにエタノールに固定して保存した。

## 7. 統計解析

交尾率、受胎率および産児の形態異常発現頻度については Yates の補正を含む  $\chi^2$  検定を行った。病理組織学的検査結果については、グレード分けしたデータについては Mann-Whitney のU検定<sup>5, 6)</sup>により、また、陽性グレードの合計値は Fisher 直接確率の片側検定<sup>6)</sup>により対照群とBBTSA各投与群との差について有意差検定を行った。その他のすべてのデータは、個体ごとに得られた値あるいは一腹ごとの平均値を1標本として、各群の分散が0より大きい場合は、先ず、Bartlett 法<sup>7)</sup>により各群の分散の一様性について検定した。その結果、分散が一樣とされた場合には、一元配置型の分散分析<sup>7)</sup>を行い、群間に有意性が認められた場合には Dunnett 法<sup>8)</sup>あるいは Scheffé 法<sup>9)</sup>により対照群とBBTSA各投与群との間で平均値の差の検定を行った。分散が一樣でなかった場

合、および分散が0となる群が存在するときは、Kruskal-Wallis 順位検定<sup>10)</sup>を行い、群間に有意性が認められた場合に、対照群とBBTSA各投与群との差について Dunnett 法<sup>8)</sup>あるいは Scheffé 法<sup>9)</sup>の検定を行った。有意水準は5%および1%とした。

## 【 結 果 】

### I. 反復投与毒性（親動物所見）

#### 1. 一般状態（Tables 1、2; Appendices 1-1~2-4）

雌雄ともにいずれの投与群にも死亡あるいは瀕死動物は認められなかった。

雌雄ともに、200 mg/kg 以上の投与群において、投与後一過性の流涎が観察された。流涎は、1000 mg/kg 投与群では、200 mg/kg 投与群と比べてより早い時期から観察され始めた。また、投与期間が進行するに従い、1000 mg/kg 投与群では投与直前から流涎を示す動物も観察された。その他の変化としては、40 mg/kg 投与群の少数例に脱毛、痂皮形成あるいは腔口周囲の血様汚染が観察された。

#### 2. 体重

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

200 mg/kg 以下の投与群の体重推移には、投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では投与期間中の体重増加が軽度抑制され、投与29~36および36~42日の増加量ならびに投与15および42日までの累積増加量が対照群と比較して有意（ $p < 0.05$ ）な低値を示した。

##### 2) 雌（Figure 2）

###### (1) 交配前（Tables 5、6; Appendices 5-1~6-4）

いずれのBBTSA投与群も、対照群と同様に推移した。

###### (2) 妊娠期（Tables 7、8; Appendices 7-1~8-4）

200 mg/kg 以下の投与群では、体重は、妊娠期を通して対照群と同様に推移した。1000 mg/kg 投与群では、妊娠期の体重増加に抑制の傾向が認められたが、増加量および累積増加量のいずれにも対照群との間で有意差は認められなかった。

###### (3) 哺育期（Tables 9、10; Appendices 9-1~10-4）

200 mg/kg 以下の投与群の体重は、対照群と同様に推移した。1000 mg/kg 投与群では、哺育0日の体重が低値の傾向を示したが対照群との間に有意差はなく、増加量は対照群と同様であった。

### 3. 摂餌量

#### 1) 雄 (Figure 3; Table 11; Appendices 11-1~11-4)

200 mg/kg 以下の投与群では、いずれの時期の摂餌量にも投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では、摂餌量の低下が認められ、投与 1～8 日の摂餌量が対照群と比較して有意 ( $p<0.01$ ) な低値を示した。

#### 2) 雌 (Figure 4)

##### (1) 交配前 (Table 12; Appendices 12-1~12-4)

200 mg/kg 以下の投与群では、いずれの時期の摂餌量も対照群との間で有意差は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では、いずれの時期の摂餌量も対照群と比較して、有意 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ) な低値を示した。

##### (2) 妊娠期 (Table 13; Appendices 13-1~13-4)

200 mg/kg 以下の投与群は対照群と同様に推移した。1000 mg/kg 投与群では、妊娠 0～7 日および妊娠 14～20 日の値がそれぞれ対照群と比較して有意 ( $p<0.05$ ) な低値を示した。

##### (3) 哺育期 (Table 14; Appendices 14-1~14-4)

いずれのBBTSA投与群も対照群と同様に推移した。

### 4. 解剖時検査所見

#### A) 雄〔解剖日：投与期間（42回投与）終了翌日〕

##### (1) 血液学的検査所見 (Table 15; Appendices 15-1~15-4)

200 mg/kg 以下の投与群では、いずれの項目にもBBTSA投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では、血色素量およびヘマトクリット値が、対照群と比較して有意 ( $p<0.01$ ) に低下した。また、赤血球数および平均赤血球容積も、有意差は認められないが、低値の傾向を示した。このほか 1000 mg/kg 投与群では、白血球数も有意 ( $p<0.01$ ) に減少したが、その他の項目に有意差は認められなかった。

##### (2) 血液生化学的検査所見 (Table 16; Appendices 16-1~16-4)

BBTSA各投与群において総ビリルビン濃度が増加の傾向を示し、200 mg/kg 以上の投与群では、有意差 ( $p<0.01$ ) も認められた。また、1000 mg/kg 投与群では、総コレステロール濃度、およびナトリウム濃度が有意 ( $p<0.05$ ) な高値を示した。ブドウ糖濃度は、

対照群と比較して、40 mg/kg 投与群が有意な ( $p<0.01$ ) 高値を、また、1000 mg/kg 投与群が有意な ( $p<0.01$ ) 低値を示した。その他の項目には対照群とBBTSA投与群との間で有意差は認められなかった。

### (3) 剖検所見 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

肝臓では 1000 mg/kg 投与群の 5 例に暗色化、40 mg/kg 投与群の 3 例に淡色あるいは黄色化がみられた。

腎臓では 200 mg/kg 投与群の 1 例、1000 mg/kg 投与群の 3 例に淡色化が、200 および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例に尿細管の明瞭化が認められた。

その他、胸腺では対照群の 1 例、1000 mg/kg 投与群の 2 例に小型化が、対照群、200 および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例に赤色域が認められ、腺胃については 200 mg/kg 投与群の 1 例の粘膜に褐色点がみられた。

### (4) 器官重量 (Table 18; Appendices 18-1~18-4)

すべてのBBTSA投与群において肝臓重量比体重値が対照群と比較して有意 ( $p<0.05$ 、 $p<0.01$ ) に増加した。また、1000 mg/kg 投与群では、腎臓重量およびその比体重値ならびに精巣重量比体重値が有意 ( $p<0.05$ 、 $p<0.01$ ) な高値を示した。胸腺、脾臓および精巣上体については、いずれの投与群も重量および比体重値ともに、対照群との間で有意差は認められなかった。

### (5) 病理組織学的検査所見 (Table 19; Appendices 19-1~19-4)

各器官における観察所見を以下に示す。

#### (肝臓)

200 mg/kg 投与群の 2 例、1000 mg/kg 投与群の 8 例の小葉中心部に肝細胞の肥大が認められた (Photos 1、2)。そのうち、1000 mg/kg 投与群の 2 例は、他と比較してその程度がやや強く、1000 mg/kg 投与群では、肝細胞肥大の程度および頻度ともに対照群と比較して有意 ( $p<0.01$ ) に増加した。また、全例に門脈周囲性の肝細胞脂肪化や小肉芽腫がみられたが、そのうち、1000 mg/kg 投与群の脂肪化の程度は、対照群と比較して軽いものであった ( $p<0.01$ )。

#### (腎臓)

対照群の 6 例、BBTSA各投与群の全例に eosinophilic body が認められ (Photos 3、4)、その頻度はすべてのBBTSA投与群が対照群と比較して有意 ( $p<0.01$ ) に高かった。また、1000 mg/kg 投与群では病変の強さも有意 ( $p<0.01$ ) に増強された。Eosinophilic



body がみられた 1000 mg/kg 投与群の 3 例 (MX04001、MX04007、MX04013) および対照群の 2 例 (MX01004、MX01007) についてPAS 染色を行った結果、1000 mg/kg 投与群、対照群いずれにも陽性反応は認められなかった (Photo 5)。また、対照群およびBBTSA 各投与群の数例の皮質に好塩基性の尿細管がみられたが、対照群とBBTSA各投与群とを比較すると、程度および頻度のいずれにも有意差は認められなかった。リンパ球浸潤が対照群の 5 例にのみ認められた。そのため、BBTSA各投与群におけるリンパ球浸潤を示す動物の頻度が対照群と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に低下した。その他、少数例に尿細管の出血、蛋白円柱あるいは嚢胞が認められた。

#### (脾臓)

全例に髄外造血および褐色色素の沈着がみられ、そのうち 1000 mg/kg 投与群では、対照群と比較すると褐色色素の沈着の程度が有意 ( $p < 0.01$ ) に増強していた。ベルリンブルー染色においても同様の変化が認められ、200 mg/kg 以上の投与群においてベルリンブルー陽性の色素沈着の程度が、対照群と比較して有意 ( $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ ) に増強されていた。

#### (その他)

胸腺では対照群の 1 例、1000 mg/kg 投与群の 2 例に萎縮、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例に出血が、心臓では対照群の 1 例に心筋の変性／線維化がみられ、精巣では対照群の 4 例、1000 mg/kg 投与群の 5 例に限局性に精子形成の減少がみられ、そのうち対照群の 2 例の精巣上体には、生殖細胞の細胞残屑が認められた。副腎および膀胱には、異常は認められなかった。

B) 雌〔解剖日：哺育 4 日、妊娠 25 日相当日 (不妊および全胚死亡例)、交配期間終了日 (交尾不成立例)〕

#### (1) 剖検所見 (Table 20; Appendices 20-1~20-4)

各器官に観察された所見を以下に示すが、妊娠および分娩の有無に関連した所見は僅かしか認められなかったため、Table 20 には全例を総括した成績のみを示した。

肝臓では 200 mg/kg 投与群の 3 例、1000 mg/kg 投与群の 5 例に暗赤色化が認められた。また、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例に淡色あるいは黄色化を伴う腫大がみられ、そのうち対照群の例では、表面が顆粒状を呈していた。

腎臓では 1000 mg/kg 投与群の 5 例に淡色化が認められ、対照群の 1 例の皮髄境界部に嚢胞が認められた。

脾臓では 200 mg/kg 投与群の 1 例に小型化が認められた。

その他、胸腺では 200 および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例に淡色化、対照群および 200 mg/kg 投与群の各 1 例に黒色点、40 mg/kg 投与群の 1 例、200 mg/kg 投与群の 3 例、1000 mg/kg 投与群の 2 例に赤色域、対照群およびBBTSA各投与群の数例に小型化がみられ、副腎では対照群に黄白色域、腺胃では 200 mg/kg 投与群の粘膜に褐色点、子宮では 1000 mg/kg 投与群の右子宮角に淡色の結節、40 mg/kg 投与群に肥厚がそれぞれ 1 例認められた。

## (2) 器官重量

### a) 哺育 4 日剖検例 (Table 21-1; Appendices 21-1~21-4)

40 mg/kg 投与群では、いずれの器官についても重量および比体重値ともに対照群との間に有意差は認められなかった。200 mg/kg 以上の投与群において、肝臓重量およびその比体重値が増加の傾向を示し、1000 mg/kg 投与群の比体重値が対照群と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) な高値を示した。1000 mg/kg 投与群では、腎臓についても比体重値が高値の傾向を示したが、対照群との間に有意差はなかった。その他の器官については重量および比体重値ともに対照群と同等であった。

### b) 交尾不成立例、不妊例、全胚死亡例 (Tables 21-2)

交尾不成立あるいは妊娠 25 日相当日まで分娩を認めなかったため、途中剖検した動物では、1000 mg/kg 投与群の肝臓および腎臓の比体重値が高値の傾向を示した。

## (3) 病理組織学的所見 (Table 22; Appendices 22-1~22-4)

各器官における観察所見を以下に示す。なお、妊娠および分娩の有無に関連した所見は僅かしか認められなかったため、Table 22 には全例を総括した成績のみを示した。

### (肝臓)

200 mg/kg 投与群の 4 例、1000 mg/kg 投与群の 5 例の小葉中心部に肝細胞の肥大が認められ、対照群と比較すると、その頻度はこれらの投与群で有意 ( $p < 0.05$ ) に増加していた (Photos 6、7)。また、全群の動物に門脈周囲性の肝細胞脂肪化や小肉芽腫がみられたが、対照群とBBTSA各投与群との間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、胆管の嚢胞が対照群の 1 例にみられ、リンパ球浸潤または髄外造血が 40 mg/kg 投与群に 1 例ずつみられた。

### (腎臓)

200 および 1000 mg/kg 投与群の 3 例の近位尿細管に空胞変性がみられ (Photos 8、9)、

そのうち 1000 mg/kg 投与群の 2 例は 200 mg/kg 投与群と比較してその程度がやや増強していたが、対照群とBBTSA各投与群間に程度および頻度の差は認められなかった。また、対照群およびBBTSA各投与群の皮質に好塩基性の尿細管がみられたが、対照群とBBTSA各投与群間に程度および頻度の差は認められなかった。その他、多発性の嚢胞が対照群の 1 例に、皮髄境界部の鉍質沈着が 1000 mg/kg 投与群の 1 例に、リンパ球浸潤が対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例にそれぞれ認められた。

#### (脾臓)

全例に髄外造血および褐色色素の沈着がみられ、そのうち 1000 mg/kg 投与群では、対照群と比較すると褐色色素の沈着の程度がやや増強する傾向が認められた。しかし、ベルリンブルー染色陽性の色素の沈着については、程度および頻度に対照群とBBTSA各投与群間で差は認められなかった。

#### (その他)

胸腺では対照群の 6 例、1000 mg/kg 投与群の 8 例に萎縮、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 2 例に出血がみられ、副腎では対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例の皮質に壊死が認められた。心臓および膀胱には、異常は認められなかった。

不妊および未交尾の雌の卵巣では、対照群および 40 mg/kg 投与群の各 1 例に軽度またはごく軽度の閉鎖卵胞の増加がみられたが、その他に異常は認められなかった。

## II. 生殖発生毒性

### 1. 生殖学的検査所見

#### 1) 交配成績 (Table 23; Appendices 23-1~23-4)

交尾率および同居開始から交尾成立までに要した日数ならびにその間に回帰した発情期の回数に、対照群とBBTSA各投与群との間で有意差は認められなかった。受胎率については、40 mg/kg および 1000 mg/kg 両投与群が低値の傾向を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった。200 mg/kg 投与群では、13例全例の妊娠が成立した。

#### 2) 分娩および哺育状態 (Table 2; Appendices 2-1~2-4)

観察が可能であった動物については、分娩状態の異常は観察されなかった。

哺育状態の異常は、いずれの動物にも認められなかった。

3) 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 24; Appendices 24-1~24-4)

妊娠黄体数、着床数および着床率に対照群とBBTSA各投与群の間で有意差は認められなかった。

4) 出産率および妊娠期間 (Table 24; Appendices 24-1~24-4)

40 mg/kg および 1000 mg/kg 投与群に1例ずつ全胚死亡例が認められたが、出産率および妊娠期間に対照群とBBTSA各投与群の間で有意差は認められなかった。

2. 出生児所見

1) 一般状態および生存性 (Table 24; Appendices 24-1~24-4)

いずれの群の出生児にも一般状態の異常は観察されなかった。

児の生存性についても、分娩率、生児出産率、出生率および新生児生存率にはBBTSA各投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

性比についても対照群とBBTSA各投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 体重 (Table 25; Appendices 25-1~25-4)

雌雄ともにいずれのBBTSA投与群も、対照群と同様に推移した。なお、40 mg/kg 投与群の1腹 (母動物番号: FB02009) は、雌の哺育0日体重測定時に操作を誤り、異常な値が測定されたため、この値は評価の対象から除外した。

3) 形態 (Tables 26, 27)

哺育0日に実施した産児の外表観察では、いずれの動物にも異常は観察されなかった (表には示さず)。

哺育4日における出生児の剖検においても、いずれの投与群の新生児にも異常は認められなかった。

死亡児の剖検でも、異常はいずれの投与群にも認められなかった。

## 【 考 察 】

BBTSAの0、40、200あるいは1000 mg/kgを、雄には42日間、雌には交配前2週間から、交配期間、妊娠期間および哺育3日まで反復経口投与した結果、雌雄ともに200 mg/kg以上の投与群において投与後一過性の流涎が認められた。流涎は、BBTSAの用量に依存して発現時期が早まることからBBTSA投与に起因した変化であると考えられる。

剖検所見にはBBTSA投与の影響を示唆する変化は認められなかったが、病理組織学的検査において、雄では、すべてのBBTSA投与群の腎臓に eosinophilic body の形成が認められ、1000 mg/kg 投与群ではその程度に増強の傾向が認められた。Eosinophilic body は雄ラットに一般的に観察される所見であるが、BBTSA各投与群においてこれを認める動物の頻度が有意に増加した。また、1000 mg/kg 投与群では、これに付随した変化として腎臓重量およびその比体重値も有意に増加した。これらのことから、eosinophilic body 形成頻度の増加はBBTSA投与の影響であると考えられる。従って、一般的な変化ではあるが、eosinophilic body 形成頻度の増加に関するBBTSAの無影響量は本試験から求められなかった。このほか雄では、対照群に認められた腎臓のリンパ球浸潤がBBTSA各投与群では認められなかったが、これは毒性変化ではない。雌では、200 mg/kg 以上の投与群において近位尿細管に空胞変性を呈するものが認められた。その頻度には対照群との間で有意差は認められなかったが、対照群には認められていない変化であり、1000 mg/kg 投与群ではその程度に増強の傾向が認められたことから、BBTSA投与による影響であると考えられる。雌の腎臓重量変化にはBBTSA投与の影響は認められず、雄の血液生化学的検査でも腎障害を示唆する変化は認められなかったことから、BBTSAの腎臓に及ぼす影響は、軽度であると考えられる。

肝臓についても雌雄ともに 200 mg/kg 以上の投与群において、小葉中心部の肝細胞の肥大する例が認められた。対照群と比較すると、雌では 200 mg/kg 以上の投与群においてその頻度が有意に増加し、雄では 1000 mg/kg 投与群において頻度および程度が有意に増加したことから、BBTSA投与による影響と考えられる。肝臓重量比体重値は、雄ではすべてのBBTSA投与群において、また、雌では 1000 mg/kg 投与群において、対照群と比較して有意な増加が認められた。しかし、200 mg/kg 投与群の雄の肝臓重量比体重値は 40 mg/kg 投与群のそれより低く、200 mg/kg 投与群では、肝細胞の肥大が肝臓重量比体重値の変動に反映されていなかった。これは、200 mg/kg 投与群で認められた肝細

肝肥大がごく軽度に分類される程度の変化であり、その頻度も13例中2例と僅かであったことによると考えられる。従って、200 mg/kg 以下の投与群の雄に認められた肝臓重量比体重値の増加はBBTSA投与による影響であるとは判断されなかった。また、1000 mg/kg 投与群における肝細胞の肥大もごく軽度から軽度の範囲に分類される程度の変化であり、血液生化学的検査においても総コレステロール濃度の僅かな増加以外に肝臓機能に関連した測定項目の変動は認められなかったことから、BBTSA投与の肝臓に対する影響は軽度であると考えられる。このほか、1000 mg/kg 投与群では門脈周囲性の肝細胞脂肪化の程度の減弱が認められた。

雄動物について実施した血液生化学的検査において、200 mg/kg 以上の投与群の総ビリルビン濃度が軽度に増加した。これらの投与群では、脾臓におけるベルリンブルー染色陽性の色素沈着の程度も増強され、さらに 1000 mg/kg 投与群では、血液学的検査において赤血球数が低値の傾向を示し、血色素量およびヘマトクリット値が有意に減少した。これらのことから、200 mg/kg 以上のBBTSA投与は溶血を惹起し、さらに、1000 mg/kg 投与は溶血性貧血を惹起するものと考えられる。40 mg/kg 投与群については、総ビリルビン濃度は 200 mg/kg 投与群と同程度の値であったが、対照群との間に有意差は認められず、脾臓の病理組織学的検査においても対照群との間に有意差は認められなかったことから、溶血は惹起されなかったものと考えられる。雌の病理組織学的検査では、1000 mg/kg 投与群の脾臓に褐色色素の沈着に増強の傾向が認められた。しかし、ベルリンブルー染色陽性の色素沈着に関しては、対照群と差は認められなかったことから、雌には溶血性の変化はなかったものと推測される。

以上のように、各器官に認められたBBTSAの影響はいずれも軽度であったが、1000 mg/kg 投与群では雄の体重増加ならびに雌雄の摂餌量に有意な低下が認められたことから、1000 mg/kg のBBTSAは、雌雄動物に対する軽度な毒性量であると考えられた。

このほか、雄の血液学的検査において 1000 mg/kg 投与群の白血球数が減少したが、脾臓の病理組織学的検査では、白血球の産生像に異常は観察されなかった。また、白血球百分比は対照群と同様であったことから、BBTSA投与との関連性は、明らかではなかった。

生殖発生毒性については、200 mg/kg 投与群では全例の交尾が成立し、雌の全例が正常に分娩した。しかし、40 mg/kg および 1000 mg/kg 両投与群では、交尾率は対照群と同程度であったが、受胎率は、対照群との間に有意差は認められなかったものの低値であった。これらの投与群において不妊であった動物は、1例を除き、いずれも交尾確認時

に腔内に精子が存在することを確認している（表には示さず）。従ってこれらの動物では精子の射入を伴う正常な交尾があったものと考えられる。1000 mg/kg 投与群では、精巣重量比体重値も増加したが、これは、同群の解剖時体重が対照群と比較して低値であったことによるもので、精巣および精巣上体の病理組織学的検査では、妊孕性の有無に関連した異常所見は認められなかった。また、不妊動物の卵巣にも病理組織学的異常は観察されず、本試験において40 および 1000 mg/kg 両投与群の受胎率が低値を示した原因は不明であった。しかし、200 mg/kg 投与群では全例が受胎したことから、40 mg/kg 投与群における受胎率低下はBBTSA投与による影響であるとは考えられない。一方、1000 mg/kg 投与群の受胎率は、40 mg/kg 投与群のそれと同程度であるが、本試験における低受胎率の原因が不明である限り、BBTSA投与の影響は否定できなかった。分娩および哺育にはBBTSA投与の影響は認められなかった。

BBTSA投与による胚・胎児死亡および産児の形態異常などの増加は認められず、出生後の生存性および体重増加にも BBTSA 投与の影響は認められなかった。

以上の成績から、本試験条件下では、反復投与毒性に関する無影響量は、雄ではすべてのBBTSA投与群で eosinophilic body の形成頻度が増加したことから 40 mg/kg/day を下回る量であると推察された。また、雌では 200 mg/kg 以上の投与群において腎臓の近位尿細管の空胞変性および小葉中心部の肝細胞の肥大が認められたことから 40 mg/kg/day であると推察される。生殖発生毒性に関する無影響量については 1000 mg/kg 投与群においてBBTSA投与の影響を否定できない受胎率の低下が認められたことから 200 mg/kg/day と推察される。

- 1) Holmberg, B., Sjögren, B.: Toxicological aspects of chemical hazards in the rubber industry.  
J. Toxicol. Environ. Health, 6: 1201-1209 (1979)
- 2) Randall, D.J., Bannister, R.M.: Acute toxicologic evaluation of SANTOCURE® NS vulcanization accelerator.  
Acute Toxicity Data in 'J. American College Toxicol.', 1: 104-105 (1990)
- 3) Korhonen, A., Hemminki, K., Vanio, H.: Embryotoxicity of benzothiazoles, benzenesulfohydrazide, and dithiodimorpholine to the chicken embryo. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 11: 753-759 (1982)
- 4) Salewski, E.: Färbemethode zum makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 247: 367 (1964)
- 5) 丹後俊郎: 医学への統計学 (古川俊之 監修)、朝倉書店、東京 (1985)
- 6) 石居進: 生物統計学入門、培風館、東京 (1992)
- 7) 佐久間昭: 薬効評価—計画と解析、東京大学出版会、東京 (1977)
- 8) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control.  
Biometrics, 20: 482-491 (1964)
- 9) Scheffé, H.: A method for judging all contrasts in the analysis of variance.  
Biometrika, 40: 87-104 (1953)



- 10) Kruskal, W. H., W. A. Wallis: Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Assoc., 47: 583-621 (1952)

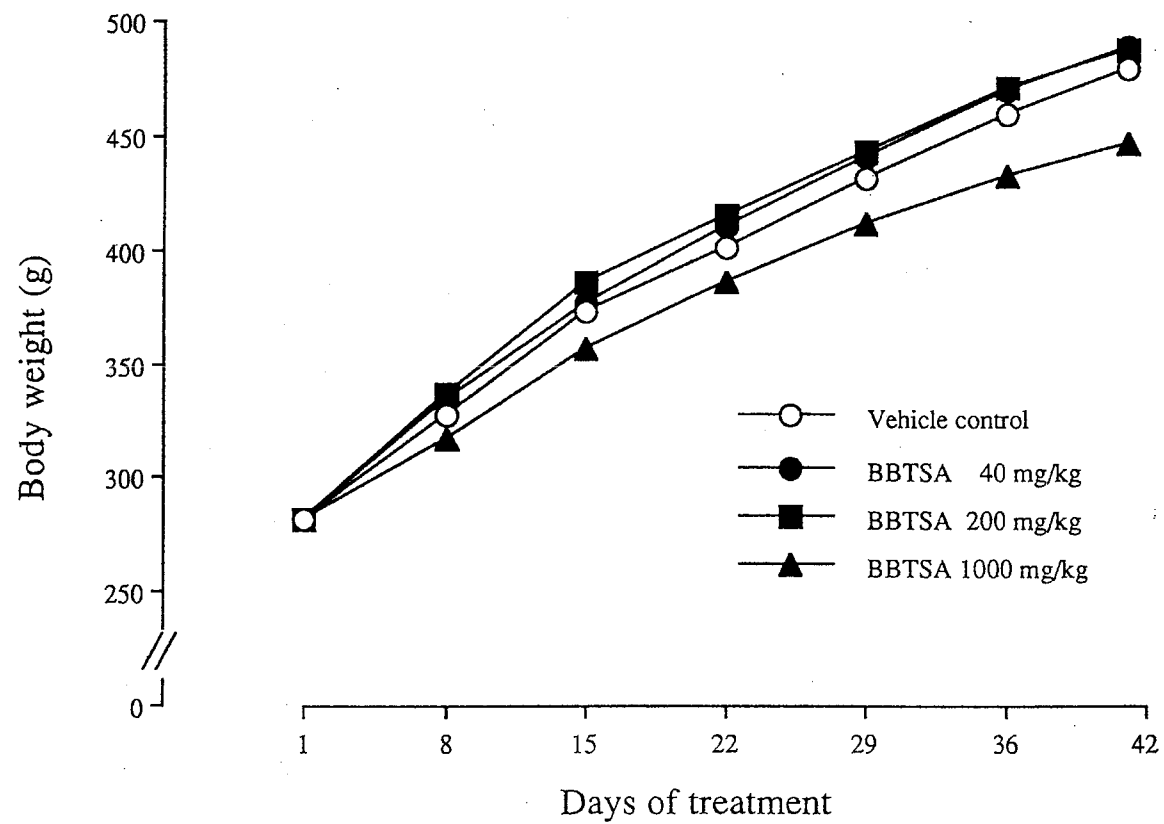


Fig. 1 Mean body weight of males

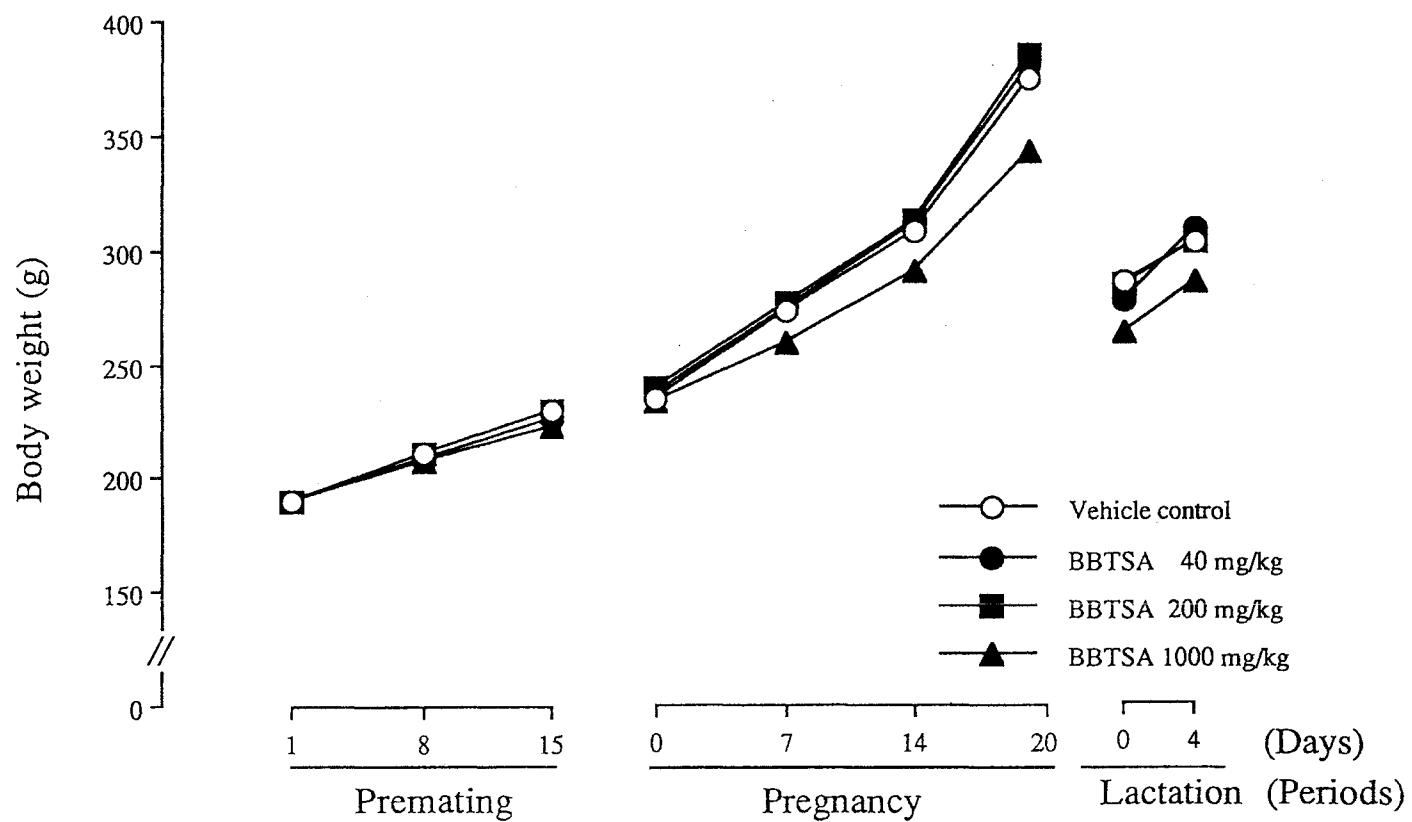


Fig. 2 Mean body weight of females

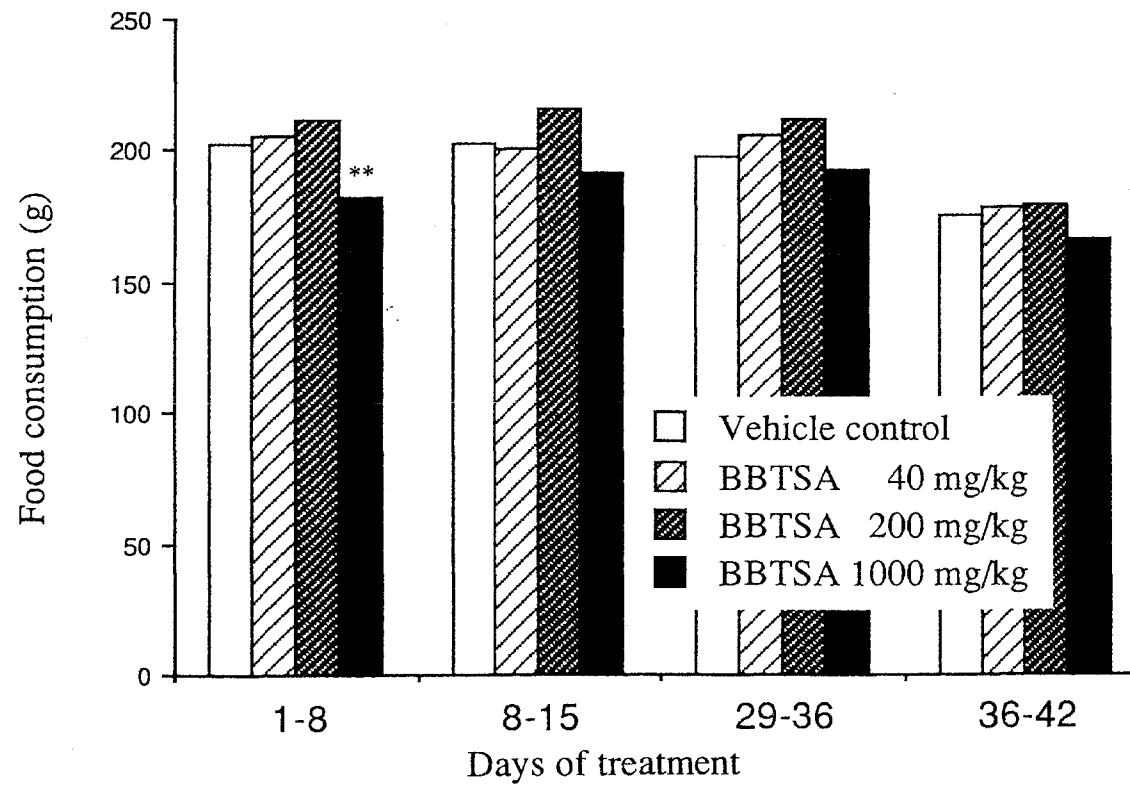


Fig. 3 Mean food consumption of males

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

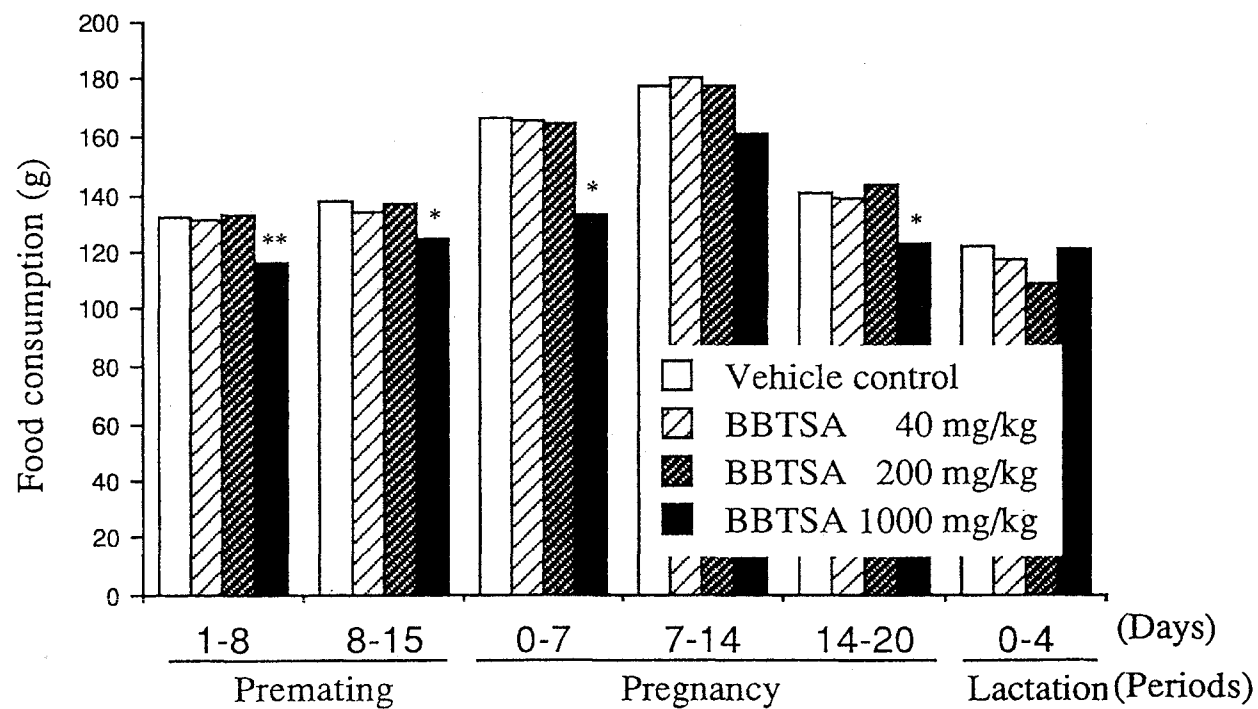


Fig. 4 Mean food consumption of females

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

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

# 【TABLE INDEX】

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

| TABLE No. | (APPENDIX No.) | TABLE TITLE                                                                                         |
|-----------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1         | ( 1-1 ~ 1-4)   | Clinical signs of F <sub>0</sub> males                                                              |
| 2         | ( 2-1 ~ 2-4)   | Clinical signs of F <sub>0</sub> females                                                            |
| 3         | ( 3-1 ~ 3-4)   | Body weight of F <sub>0</sub> males                                                                 |
| 4         | ( 4-1 ~ 4-4)   | Body weight gain of F <sub>0</sub> males                                                            |
| 5         | ( 5-1 ~ 5-4)   | Body weight of F <sub>0</sub> females during premating period                                       |
| 6         | ( 6-1 ~ 6-4)   | Body weight gain of F <sub>0</sub> females during premating period                                  |
| 7         | ( 7-1 ~ 7-4)   | Body weight of F <sub>0</sub> females during pregnancy period                                       |
| 8         | ( 8-1 ~ 8-4)   | Body weight gain of F <sub>0</sub> females during pregnancy period                                  |
| 9         | ( 9-1 ~ 9-4)   | Body weight of F <sub>0</sub> females during lactation period                                       |
| 10        | (10-1 ~10-4)   | Body weight gain of F <sub>0</sub> females during lactation period                                  |
| 11        | (11-1 ~11-4)   | Food consumption of F <sub>0</sub> males                                                            |
| 12        | (12-1 ~12-4)   | Food consumption of F <sub>0</sub> females during premating period                                  |
| 13        | (13-1 ~13-4)   | Food consumption of F <sub>0</sub> females during pregnancy period                                  |
| 14        | (14-1 ~14-4)   | Food consumption of F <sub>0</sub> females during lactation period                                  |
| 15        | (15-1 ~15-4)   | Hematological findings of F <sub>0</sub> males after oral administration for 42 days                |
| 16        | (16-1 ~16-4)   | Biochemical findings of F <sub>0</sub> males after oral administration for 42 days                  |
| 17        | (17-1 ~17-4)   | Summary of macroscopic findings in F <sub>0</sub> males after oral administration for 42 days       |
| 18        | (18-1 ~18-4)   | Absolute and relative organ weight of F <sub>0</sub> males after oral administration for 42 days    |
| 19        | (19-1 ~19-4)   | Summary of histopathological findings in F <sub>0</sub> males after oral administration for 42 days |
| 20        | (20-1 ~20-4)   | Summary of macroscopic findings of F <sub>0</sub> females                                           |

|      |              |                                                                                                     |
|------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 21-1 | (21-1 ~21-4) | Absolute and relative organ weights of F <sub>0</sub> females on day 4 of lactation                 |
| 21-2 |              | Absolute and relative organ weights of F <sub>0</sub> females; sacrificed on the way of test period |
| 22   | (22-1 ~22-4) | Summary of histopathological findings of F <sub>0</sub> females                                     |
| 23   | (23-1 ~23-4) | Reproductive performance of animals                                                                 |
| 24   | (24-1 ~24-4) | Summary of development of F <sub>1</sub> pups up to day 4 of lactation                              |
| 25   | (25-1 ~25-4) | Body weight of F <sub>1</sub> pups up to day 4 of lactation                                         |
| 26   |              | Summary of morphological observation of pups on day 4 of lactation                                  |
| 27   |              | Summary of morphological observation of dead pups                                                   |

Table 1

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Clinical signs of F<sub>0</sub> males

| Clinical signs         | BBTSA<br>(mg/kg) | Initial number<br>of<br>animals | Number of animals with clinical signs |          |         |         |         |         | Total |
|------------------------|------------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|-------|
|                        |                  |                                 | Dosing period                         |          |         |         |         |         |       |
|                        |                  |                                 | T 1 ~T 7                              | T 8 ~T14 | T15~T21 | T22~T28 | T29~T35 | T36~T42 |       |
| Temporary salivation   | 0                | 13                              | 0                                     | 0        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                        | 40               | 13                              | 0                                     | 0        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                        | 200              | 13                              | 0                                     | 9        | 11      | 13      | 13      | 12      | 13    |
|                        | 1000             | 13                              | 10                                    | 12       | 13      | 13      | 13      | 13      | 13    |
| Incrustation           | 0                | 13                              | 0                                     | 0        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                        | 40               | 13                              | 0                                     | 0        | 2       | 1       | 2       | 0       | 3     |
|                        | 200              | 13                              | 0                                     | 0        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                        | 1000             | 13                              | 0                                     | 0        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
| Focal loss of the hair | 0                | 13                              | 0                                     | 0        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                        | 40               | 13                              | 0                                     | 0        | 2       | 1       | 2       | 2       | 3     |
|                        | 200              | 13                              | 0                                     | 0        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                        | 1000             | 13                              | 0                                     | 0        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |

T:treatment days



Table 2

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Clinical signs of Fo females

| Clinical signs                       | BBTSA<br>(mg/kg) | Initial number<br>of<br>animals | Number of animals with clinical signs |            |             |             |             |             |                |                |                |                |                |    | Total |
|--------------------------------------|------------------|---------------------------------|---------------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----|-------|
|                                      |                  |                                 | Dosing period                         |            |             |             |             |             | L <sub>0</sub> | L <sub>1</sub> | L <sub>2</sub> | L <sub>3</sub> | L <sub>4</sub> |    |       |
|                                      |                  |                                 | T 1 ~ T 7                             | T 8 ~ T 14 | T 15 ~ T 21 | T 22 ~ T 28 | T 29 ~ T 35 | T 36 ~ T 48 |                |                |                |                |                |    |       |
| Temporary salivation                 | 0                | 13                              | 0                                     | 0          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0  |       |
|                                      | 40               | 13                              | 0                                     | 0          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0  |       |
|                                      | 200              | 13                              | 0                                     | 0          | 2           | 4           | 6           | 1           | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 8  |       |
|                                      | 1000             | 13                              | 10                                    | 13         | 13          | 12          | 11          | 9           | 1              | 2              | 3              | 4              | 0              | 13 |       |
| Reddish discharge<br>from the vagina | 0                | 13                              | 0                                     | 0          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0  |       |
|                                      | 40               | 13                              | 0                                     | 0          | 0           | 0           | 0           | 1           | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 1  |       |
|                                      | 200              | 13                              | 0                                     | 0          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0  |       |
|                                      | 1000             | 13                              | 0                                     | 0          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0  |       |

T: treatment days

L: lactational days

Table 3

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F<sub>0</sub> males (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound              | BBTSA           |              |       |              |       |              |       |              |
|-----------------------|-----------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup> |              | 40    |              | 200   |              | 1000  |              |
| Days of treatment     |                 |              |       |              |       |              |       |              |
| 1 (Initial weight)    | 281.4           | ± 8.6 ( 13)  | 281.8 | ± 9.4 ( 13)  | 281.9 | ± 9.9 ( 13)  | 281.9 | ± 9.0 ( 13)  |
| 8                     | 327.1           | ± 15.8 ( 13) | 333.7 | ± 16.4 ( 13) | 336.2 | ± 17.2 ( 13) | 317.3 | ± 17.8 ( 13) |
| 15                    | 372.7           | ± 18.2 ( 13) | 376.4 | ± 22.0 ( 13) | 385.1 | ± 21.1 ( 13) | 357.0 | ± 24.2 ( 13) |
| 22                    | 401.3           | ± 23.7 ( 13) | 410.3 | ± 27.7 ( 13) | 414.9 | ± 22.0 ( 13) | 385.6 | ± 30.2 ( 13) |
| 29                    | 430.6           | ± 27.5 ( 13) | 440.8 | ± 33.0 ( 13) | 442.5 | ± 24.5 ( 13) | 411.5 | ± 36.1 ( 13) |
| 36                    | 458.6           | ± 32.8 ( 13) | 469.2 | ± 36.0 ( 13) | 471.1 | ± 27.3 ( 13) | 431.9 | ± 40.6 ( 13) |
| 42                    | 479.4           | ± 37.7 ( 13) | 488.2 | ± 37.7 ( 13) | 487.2 | ± 31.3 ( 13) | 445.8 | ± 44.5 ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)

Table 4

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F<sub>0</sub> males (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound              | BBTSA              |                    |                    |                     |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                 | 200                | 1000                |
| Days of treatment     |                    |                    |                    |                     |
| 1 ~ 8                 | 45.7 ± 12.2 ( 13)  | 51.9 ± 9.8 ( 13)   | 54.3 ± 9.5 ( 13)   | 35.4 ± 12.2 ( 13)   |
| 8 ~ 15                | 45.6 ± 6.4 ( 13)   | 42.7 ± 8.1 ( 13)   | 48.9 ± 6.5 ( 13)   | 39.7 ± 8.4 ( 13)    |
| 15 ~ 22               | 28.6 ± 8.3 ( 13)   | 34.0 ± 9.9 ( 13)   | 29.8 ± 6.5 ( 13)   | 28.6 ± 8.1 ( 13)    |
| 22 ~ 29               | 29.2 ± 5.7 ( 13)   | 30.4 ± 6.5 ( 13)   | 27.7 ± 6.3 ( 13)   | 25.9 ± 7.8 ( 13)    |
| 29 ~ 36               | 28.0 ± 7.7 ( 13)   | 28.4 ± 6.5 ( 13)   | 28.6 ± 6.0 ( 13)   | 20.4 ± 7.7* ( 13)   |
| 36 ~ 42               | 20.8 ± 6.3 ( 13)   | 19.0 ± 6.0 ( 13)   | 16.1 ± 6.3 ( 13)   | 13.9 ± 6.9* ( 13)   |
| -----                 |                    |                    |                    |                     |
| 1 ~ 15                | 91.3 ± 14.5 ( 13)  | 94.6 ± 16.5 ( 13)  | 103.2 ± 14.0 ( 13) | 75.2 ± 19.7* ( 13)  |
| 1 ~ 22                | 119.9 ± 19.9 ( 13) | 128.6 ± 22.7 ( 13) | 133.0 ± 16.1 ( 13) | 103.7 ± 26.0 ( 13)  |
| 1 ~ 29                | 149.1 ± 23.3 ( 13) | 159.0 ± 27.8 ( 13) | 160.6 ± 18.6 ( 13) | 129.7 ± 32.4 ( 13)  |
| 1 ~ 36                | 177.2 ± 28.0 ( 13) | 187.5 ± 31.2 ( 13) | 189.2 ± 20.8 ( 13) | 150.0 ± 36.6 ( 13)  |
| 1 ~ 42                | 197.9 ± 32.7 ( 13) | 206.5 ± 33.8 ( 13) | 205.3 ± 24.6 ( 13) | 164.0 ± 41.0* ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)\* : significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)

Table 5

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F<sub>0</sub> females during premating period (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound              | BBTSA              |                    |                    |                   |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                 | 200                | 1000              |
| Days of treatment     |                    |                    |                    |                   |
| 1 (Initial weight)    | 190.2 ± 7.2 ( 13)  | 189.5 ± 6.4 ( 13)  | 189.7 ± 6.8 ( 13)  | 190.0 ± 5.8 ( 13) |
| 8                     | 211.2 ± 8.2 ( 13)  | 208.2 ± 10.0 ( 13) | 211.4 ± 8.1 ( 13)  | 207.3 ± 7.6 ( 13) |
| 15                    | 229.8 ± 11.8 ( 13) | 225.9 ± 11.7 ( 13) | 229.5 ± 10.9 ( 13) | 222.5 ± 8.6 ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)

Table 6

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of Fo females during premating period (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound           | BBTSA                 |                      |                      |                      |
|--------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                    | 0 <sup>a)</sup>       | 40                   | 200                  | 1000                 |
| Dose group (mg/kg) |                       |                      |                      |                      |
| Days of treatment  |                       |                      |                      |                      |
| 1 ~ 8              | 21.1 $\pm$ 7.2 ( 13)  | 18.7 $\pm$ 6.4 ( 13) | 21.7 $\pm$ 4.9 ( 13) | 17.3 $\pm$ 6.0 ( 13) |
| 8 ~15              | 18.6 $\pm$ 5.3 ( 13)  | 17.7 $\pm$ 5.4 ( 13) | 18.1 $\pm$ 4.9 ( 13) | 15.2 $\pm$ 6.8 ( 13) |
| 1 ~15              | 39.6 $\pm$ 10.7 ( 13) | 36.4 $\pm$ 8.7 ( 13) | 39.8 $\pm$ 8.0 ( 13) | 32.5 $\pm$ 6.5 ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)

Table 7

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F<sub>0</sub> females during pregnancy period (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          | BBTSA                  |                       |                        |                       |
|-------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|                   | 0 <sup>a)</sup>        | 40                    | 200                    | 1000                  |
| Days of pregnancy |                        |                       |                        |                       |
| 0                 | 234.2 $\pm$ 13.5 ( 10) | 236.9 $\pm$ 21.0 ( 7) | 239.0 $\pm$ 11.5 ( 13) | 233.5 $\pm$ 16.4 ( 9) |
| 7                 | 272.2 $\pm$ 17.1 ( 10) | 273.8 $\pm$ 29.3 ( 7) | 276.0 $\pm$ 16.2 ( 13) | 258.9 $\pm$ 19.0 ( 9) |
| 14                | 308.1 $\pm$ 18.1 ( 10) | 311.3 $\pm$ 34.9 ( 7) | 312.5 $\pm$ 17.7 ( 13) | 290.4 $\pm$ 22.6 ( 9) |
| 20                | 374.1 $\pm$ 23.4 ( 10) | 380.4 $\pm$ 41.4 ( 7) | 385.1 $\pm$ 26.1 ( 13) | 343.0 $\pm$ 40.4 ( 9) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)

Table 8

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F<sub>0</sub> females during pregnancy period (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound              | BBTSA              |                   |                    |                   |
|-----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                | 200                | 1000              |
| Days of pregnancy     |                    |                   |                    |                   |
| 0 ~ 7                 | 38.0 ± 8.5 ( 10)   | 36.9 ± 11.6 ( 7)  | 37.0 ± 7.0 ( 13)   | 25.4 ± 11.7 ( 9)  |
| 7 ~ 14                | 35.9 ± 4.3 ( 10)   | 37.5 ± 13.1 ( 7)  | 36.5 ± 6.2 ( 13)   | 31.6 ± 7.8 ( 9)   |
| 14 ~ 20               | 66.0 ± 16.2 ( 10)  | 69.1 ± 19.5 ( 7)  | 72.6 ± 18.5 ( 13)  | 52.5 ± 19.0 ( 9)  |
| -----                 |                    |                   |                    |                   |
| 0 ~ 14                | 74.0 ± 8.4 ( 10)   | 74.4 ± 21.9 ( 7)  | 73.5 ± 11.0 ( 13)  | 56.9 ± 13.9 ( 9)  |
| 0 ~ 20                | 139.9 ± 20.7 ( 10) | 143.5 ± 35.3 ( 7) | 146.1 ± 23.7 ( 13) | 109.5 ± 30.2 ( 9) |

<sup>a)</sup>: vehicle control : 5 % gum arabic (5 ml/kg)

Table 9

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of Fo females during lactation period (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound           | BBTSA                  |                       |                        |                       |
|--------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|                    | 0 <sup>a)</sup>        | 40                    | 200                    | 1000                  |
| Dose group (mg/kg) |                        |                       |                        |                       |
| Days of lactation  |                        |                       |                        |                       |
| 0                  | 284.2 $\pm$ 23.2 ( 10) | 276.6 $\pm$ 37.3 ( 6) | 283.6 $\pm$ 26.2 ( 13) | 262.2 $\pm$ 27.4 ( 8) |
| 4                  | 302.5 $\pm$ 14.1 ( 10) | 308.1 $\pm$ 29.3 ( 6) | 301.5 $\pm$ 20.3 ( 13) | 284.9 $\pm$ 34.6 ( 8) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)



Table 10

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F<sub>0</sub> females during lactation period (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound              | BBTSA                 |                      |                       |                      |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
|                       | 0 <sup>a)</sup>       | 40                   | 200                   | 1000                 |
| Dose group<br>(mg/kg) |                       |                      |                       |                      |
| Days of lactation     |                       |                      |                       |                      |
| 0 ~ 4                 | 18.3 $\pm$ 15.1 ( 10) | 31.5 $\pm$ 12.5 ( 6) | 17.9 $\pm$ 18.8 ( 13) | 22.7 $\pm$ 16.6 ( 8) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)

Table 11

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F<sub>0</sub> males (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound              | BBTSA              |                    |                    |                      |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                 | 200                | 1000                 |
| Days of treatment     |                    |                    |                    |                      |
| 1 ~ 8                 | 202.8 ± 22.7 ( 13) | 205.7 ± 10.9 ( 13) | 211.1 ± 13.3 ( 13) | 181.9 ± 15.5** ( 13) |
| 8 ~ 15                | 202.9 ± 19.4 ( 13) | 200.1 ± 11.1 ( 13) | 215.4 ± 13.5 ( 13) | 191.1 ± 21.3 ( 13)   |
| 29 ~ 36               | 197.4 ± 20.4 ( 13) | 205.2 ± 21.8 ( 13) | 211.4 ± 18.5 ( 13) | 192.7 ± 25.4 ( 13)   |
| 36 ~ 42               | 174.9 ± 18.6 ( 13) | 177.9 ± 19.6 ( 13) | 179.6 ± 14.3 ( 13) | 165.8 ± 20.3 ( 13)   |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)

\*\*: significant difference from control, p&lt;0.01 (by multiple comparisons)

Table 12

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F<sub>0</sub> females during prematuring period (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          | BBTSA                  |                        |                        |                                     |
|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
|                   | 0 <sup>a)</sup>        | 40                     | 200                    | 1000                                |
| Days of treatment |                        |                        |                        |                                     |
| 1 ~ 8             | 132.5 $\pm$ 7.3 ( 13)  | 130.8 $\pm$ 8.9 ( 13)  | 133.2 $\pm$ 9.3 ( 13)  | 116.7 $\pm$ 8.0 <sup>**</sup> ( 13) |
| 8 ~ 15            | 137.3 $\pm$ 10.8 ( 13) | 134.1 $\pm$ 12.9 ( 13) | 136.8 $\pm$ 11.7 ( 13) | 124.7 $\pm$ 12.5 <sup>*</sup> ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)<sup>\*</sup> : significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)<sup>\*\*</sup>: significant difference from control,  $p < 0.01$  (by multiple comparisons)

Table 13

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F<sub>0</sub> females during pregnancy period (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound              | BBTSA              |                   |                    |                    |
|-----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                | 200                | 1000               |
| Days of pregnancy     |                    |                   |                    |                    |
| 0 ~ 7                 | 166.8 ± 16.9 ( 10) | 165.3 ± 29.1 ( 7) | 164.2 ± 16.5 ( 13) | 133.4 ± 25.8* ( 9) |
| 7 ~ 14                | 177.9 ± 15.2 ( 10) | 180.9 ± 29.4 ( 7) | 177.9 ± 15.2 ( 13) | 161.2 ± 16.3 ( 9)  |
| 14 ~ 20               | 140.9 ± 8.8 ( 10)  | 138.3 ± 9.8 ( 7)  | 143.3 ± 11.7 ( 13) | 122.4 ± 16.3* ( 9) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)\*: significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)

Table 14

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F<sub>0</sub> females during lactation period (g) ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound              | BBTSA              |                   |                    |                   |
|-----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                | 200                | 1000              |
| Days of lactation     |                    |                   |                    |                   |
| 0 ~ 4                 | 122.3 ± 21.9 ( 10) | 117.6 ± 15.0 ( 6) | 108.8 ± 25.8 ( 13) | 121.2 ± 25.3 ( 8) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)

Table 15

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats  
Hematological findings of F<sub>0</sub> males after oral administration for 42 days

| BBTSA<br>(mg/kg) | RBC<br>(x10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> ) | Hemoglobin<br>(g/dl)     | Hematocrit<br>(%)        | MCV<br>( μm <sup>3</sup> ) | MCH<br>(pg)           | MCHC<br>(%)           | Platelet<br>(x10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> ) |
|------------------|---------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|
| 0                | (13)<br>805<br>± 35                         | (13)<br>15.4<br>± 0.6    | (13)<br>44.4<br>± 1.6    | (13)<br>55.2<br>± 1.7      | (13)<br>19.1<br>± 0.7 | (13)<br>34.6<br>± 0.6 | (13)<br>114.1<br>± 8.2                           |
| 40               | (13)<br>814<br>± 40                         | (13)<br>15.5<br>± 0.7    | (13)<br>44.7<br>± 1.9    | (13)<br>55.0<br>± 2.1      | (13)<br>19.0<br>± 0.8 | (13)<br>34.6<br>± 0.4 | (13)<br>112.5<br>± 10.1                          |
| 200              | (13)<br>807<br>± 31                         | (13)<br>15.3<br>± 0.5    | (13)<br>43.7<br>± 1.7    | (13)<br>54.2<br>± 1.1      | (13)<br>18.9<br>± 0.4 | (13)<br>35.0<br>± 0.4 | (13)<br>111.9<br>± 8.9                           |
| 1000             | (13)<br>774<br>± 40                         | (13)<br>14.5 **<br>± 0.4 | (13)<br>41.6 **<br>± 1.6 | (13)<br>53.7<br>± 1.1      | (13)<br>18.7<br>± 0.5 | (13)<br>34.8<br>± 0.5 | (13)<br>115.8<br>± 8.1                           |

| BBTSA<br>(mg/kg) | WBC<br>(x100/mm <sup>3</sup> ) | Band<br>neutrophil<br>(%) | Segmented<br>neutrophil<br>(%) | Eosinophil<br>(%) | Basophil<br>(%)  | Monocyte<br>(%)  | Lymphocyte<br>(%)  |
|------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|
| 0                | (13)<br>116<br>± 20            | (13)<br>0<br>± 0          | (13)<br>10<br>± 4              | (13)<br>0<br>± 1  | (13)<br>0<br>± 0 | (13)<br>2<br>± 2 | (13)<br>87<br>± 5  |
| 40               | (13)<br>111<br>± 23            | (13)<br>0<br>± 0          | (13)<br>10<br>± 5              | (13)<br>1<br>± 1  | (13)<br>0<br>± 0 | (13)<br>2<br>± 2 | (13)<br>87<br>± 6  |
| 200              | (13)<br>101<br>± 19            | (13)<br>0<br>± 0          | (13)<br>15<br>± 10             | (13)<br>1<br>± 1  | (13)<br>0<br>± 0 | (13)<br>1<br>± 1 | (13)<br>83<br>± 10 |
| 1000             | (13)<br>86 **<br>± 28          | (13)<br>0<br>± 0          | (13)<br>16<br>± 11             | (13)<br>1<br>± 1  | (13)<br>0<br>± 0 | (13)<br>2<br>± 2 | (13)<br>81<br>± 11 |

Parameter : mean±S.D.

( ) : number of animals

\* : Significantly different from vehicle control, p&lt;0.05

\*\* : Significantly different from vehicle control, p&lt;0.01

Table 16

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats  
 Biochemical findings of F<sub>0</sub> males after oral administration for 42 days

| BBTSA<br>(mg/kg) | Total<br>protein<br>(g/dl) | Albumin<br>(g/dl)     | A/G                    | BUN<br>(mg/dl)      | Creatinine<br>(mg/dl)      | Glucose<br>(mg/dl)     | Total<br>cholesterol<br>(mg/dl) | Total<br>bilirubin<br>(mg/dl) |
|------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| 0                | (13)<br>5.5<br>±0.3        | (13)<br>2.8<br>±0.2   | (13)<br>1.05<br>±0.08  | (13)<br>17<br>± 2   | (13)<br>0.7<br>±0.1        | (13)<br>137<br>± 13    | (13)<br>59<br>±13               | (13)<br>0.07<br>±0.02         |
| 4 0              | (13)<br>5.6<br>±0.3        | (13)<br>2.9<br>±0.3   | (13)<br>1.06<br>±0.15  | (13)<br>17<br>± 2   | (13)<br>0.7<br>±0.1        | (13)<br>157 **<br>± 14 | (13)<br>58<br>±11               | (13)<br>0.09<br>±0.02         |
| 2 0 0            | (13)<br>5.8<br>±0.2        | (13)<br>3.0<br>±0.1   | (13)<br>1.08<br>±0.12  | (13)<br>17<br>± 2   | (13)<br>0.7<br>±0.0        | (13)<br>141<br>± 12    | (13)<br>59<br>± 8               | (13)<br>0.09 **<br>±0.02      |
| 1 0 0 0          | (13)<br>5.7<br>±0.4        | (13)<br>3.0<br>±0.1   | (13)<br>1.10<br>±0.15  | (13)<br>18<br>± 2   | (13)<br>0.7<br>±0.1        | (13)<br>120 **<br>± 15 | (13)<br>70 *<br>±12             | (13)<br>0.10 **<br>±0.02      |
| BBTSA<br>(mg/kg) | Na<br>(mEq/l)              | K<br>(mEq/l)          | Cl<br>(mEq/l)          | Ca<br>(mg/dl)       | Inorg.<br>phos.<br>(mg/dl) | ALP<br>(U/l)           | GOT<br>(U/l)                    | γ-GTP<br>(U/l)                |
| 0                | (13)<br>144.5<br>± 1.1     | (13)<br>3.77<br>±0.23 | (13)<br>106.6<br>± 1.4 | (13)<br>8.6<br>±0.4 | (13)<br>6.2<br>±0.6        | (13)<br>199<br>± 41    | (13)<br>58<br>± 7               | (13)<br>0<br>± 0              |
| 4 0              | (13)<br>144.4<br>± 0.9     | (13)<br>3.76<br>±0.13 | (13)<br>105.8<br>± 0.9 | (13)<br>8.6<br>±0.5 | (13)<br>6.2<br>±0.5        | (13)<br>218<br>± 54    | (13)<br>59<br>± 7               | (13)<br>0<br>± 0              |
| 2 0 0            | (13)<br>144.6<br>± 0.9     | (13)<br>3.83<br>±0.22 | (13)<br>105.9<br>± 1.0 | (13)<br>8.7<br>±0.2 | (13)<br>5.7<br>±0.4        | (13)<br>220<br>± 38    | (13)<br>60<br>± 6               | (13)<br>0<br>± 0              |
| 1 0 0 0          | (13)<br>145.6 *<br>± 0.7   | (13)<br>3.91<br>±0.20 | (13)<br>106.0<br>± 1.2 | (13)<br>8.9<br>±0.2 | (13)<br>5.8<br>±0.5        | (13)<br>205<br>± 65    | (13)<br>59<br>±10               | (13)<br>0<br>± 0              |

Parameter : mean±S.D.  
 ( ) : number of animals

\* : Significantly different from vehicle control, p<0.05  
 \*\* : Significantly different from vehicle control, p<0.01

Table 17

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of macroscopic findings in Fo males after oral administration for 42 days

| Group<br>Grade              | Control |   | 40 mg/kg |   | 200 mg/kg |   | 1000 mg/kg |   |
|-----------------------------|---------|---|----------|---|-----------|---|------------|---|
|                             | -       | + | -        | + | -         | + | -          | + |
| (Liver)                     | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| dark color                  | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 8          | 5 |
| pale color/yellowish        | 13      | 0 | 10       | 3 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Kidney)                    | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| pale color                  | 13      | 0 | 13       | 0 | 12        | 1 | 10         | 3 |
| accentuated tubular pattern | 13      | 0 | 13       | 0 | 12        | 1 | 12         | 1 |
| (Thymus)                    | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| small                       | 12      | 1 | 13       | 0 | 13        | 0 | 11         | 2 |
| reddish area                | 12      | 1 | 13       | 0 | 12        | 1 | 12         | 1 |
| (Glandular stomach)         | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| brownish spot on mucosa     | 13      | 0 | 13       | 0 | 12        | 1 | 13         | 0 |

-, Negative; +, Positive

[ ], Number of animals examined



Table 18

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weight of F<sub>0</sub> males after oral administration for 42 days ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound                 | Dose group<br>(mg/kg) | BBTSA                                                                 |                                             |                                            |                                             |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                          |                       | 0 <sup>a)</sup>                                                       | 40                                          | 200                                        | 1000                                        |
| Terminal body weight (g) |                       | 447.2 $\pm$ 35.0 ( 13)                                                | 458.4 $\pm$ 36.1 ( 13)                      | 455.9 $\pm$ 29.2 ( 13)                     | 416.5 $\pm$ 42.4 ( 13)                      |
| Liver (g)                |                       | 12.57 $\pm$ 1.73 <sup>b)</sup> ( 13)<br>2.80 $\pm$ 0.21 <sup>c)</sup> | 14.21 $\pm$ 1.78 ( 13)<br>3.09 $\pm$ 0.22** | 13.65 $\pm$ 0.98 ( 13)<br>3.00 $\pm$ 0.15* | 13.41 $\pm$ 1.53 ( 13)<br>3.22 $\pm$ 0.22** |
| Kidneys (g)              |                       | 2.94 $\pm$ 0.32 ( 13)<br>0.66 $\pm$ 0.06                              | 3.03 $\pm$ 0.26 ( 13)<br>0.66 $\pm$ 0.05    | 3.16 $\pm$ 0.27 ( 13)<br>0.69 $\pm$ 0.05   | 3.27 $\pm$ 0.25* ( 13)<br>0.79 $\pm$ 0.06** |
| Spleen (g)               |                       | 0.77 $\pm$ 0.11 ( 13)<br>0.17 $\pm$ 0.02                              | 0.76 $\pm$ 0.07 ( 13)<br>0.17 $\pm$ 0.02    | 0.76 $\pm$ 0.09 ( 13)<br>0.17 $\pm$ 0.02   | 0.73 $\pm$ 0.10 ( 13)<br>0.18 $\pm$ 0.02    |
| Thymus (mg)              |                       | 389.8 $\pm$ 122.5 ( 13)<br>86.8 $\pm$ 25.7                            | 370.1 $\pm$ 55.2 ( 13)<br>80.8 $\pm$ 10.8   | 375.7 $\pm$ 67.3 ( 13)<br>82.5 $\pm$ 14.9  | 313.5 $\pm$ 97.5 ( 13)<br>74.3 $\pm$ 18.3   |
| Testes (g)               |                       | 3.04 $\pm$ 0.29 ( 13)<br>0.68 $\pm$ 0.06                              | 3.01 $\pm$ 0.21 ( 13)<br>0.66 $\pm$ 0.07    | 3.02 $\pm$ 0.38 ( 13)<br>0.66 $\pm$ 0.07   | 3.14 $\pm$ 0.21 ( 13)<br>0.76 $\pm$ 0.09*   |
| Epididymides (g)         |                       | 1.10 $\pm$ 0.12 ( 13)<br>0.24 $\pm$ 0.03                              | 1.04 $\pm$ 0.10 ( 13)<br>0.23 $\pm$ 0.03    | 1.07 $\pm$ 0.13 ( 13)<br>0.23 $\pm$ 0.03   | 1.06 $\pm$ 0.10 ( 13)<br>0.26 $\pm$ 0.04    |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)<sup>b)</sup>: absolute weight<sup>c)</sup>: relative weight (g or mg per 100g body weight)\* : significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)\*\* : significant difference from control,  $p < 0.01$  (by multiple comparisons)

Table 19

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of histopathological findings in Fo males after oral administration for 42 days

| Group                         | Control |    |    |    |     |      | 40 mg/kg |    |    |    |     |      | 200 mg/kg |    |   |    |     |      | 1000 mg/kg |    |    |    |     |      |
|-------------------------------|---------|----|----|----|-----|------|----------|----|----|----|-----|------|-----------|----|---|----|-----|------|------------|----|----|----|-----|------|
| Grade                         | -       | ±  | +  | ++ | +++ | Pos. | -        | ±  | +  | ++ | +++ | Pos. | -         | ±  | + | ++ | +++ | Pos. | -          | ±  | +  | ++ | +++ | Pos. |
| (Liver)                       | [13]    |    |    |    |     |      | [13]     |    |    |    |     |      | [13]      |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Hypertrophy, hepatocyte,      | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13       | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 11        | 2  | 0 | 0  | 0   | 2    | 5          | 6  | 2  | 0  | 0** | 8##  |
| centrilobular                 | 0       | 0  | 13 | 0  | 0   | 13   | 0        | 2  | 11 | 0  | 0   | 13   | 0         | 5  | 8 | 0  | 0   | 13   | 0          | 13 | 0  | 0  | 0** | 13   |
| Fatty change, periportal      | 0       | 11 | 2  | 0  | 0   | 13   | 0        | 11 | 2  | 0  | 0   | 13   | 0         | 11 | 2 | 0  | 0   | 13   | 0          | 11 | 2  | 0  | 0   | 13   |
| Microgranuloma                | [13]    |    |    |    |     |      | [13]     |    |    |    |     |      | [13]      |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| (Kidney)                      | 7       | 2  | 1  | 3  | 0   | 6    | 0        | 5  | 7  | 1  | 0   | 13## | 0         | 6  | 5 | 1  | 1   | 13## | 0          | 1  | 2  | 10 | 0** | 13## |
| Eosinophilic body             | 4       | 7  | 2  | 0  | 0   | 9    | 4        | 9  | 0  | 0  | 0   | 9    | 6         | 5  | 1 | 1  | 0   | 7    | 5          | 8  | 0  | 0  | 0   | 8    |
| Basophilic tubule, cortex     | 12      | 1  | 0  | 0  | 0   | 1    | 13       | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13        | 0  | 0 | 0  | 0   | 0    | 13         | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |
| Cyst                          | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13       | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 12        | 1  | 0 | 0  | 0   | 1    | 13         | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |
| Hemorrhage, renal tubule      | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13       | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 11        | 2  | 0 | 0  | 0   | 2    | 13         | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |
| Proteinous cast               | [13]    |    |    |    |     |      | [13]     |    |    |    |     |      | [13]      |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Cellular infiltration,        | 8       | 4  | 1  | 0  | 0   | 5    | 13       | 0  | 0  | 0  | 0   | 0#   | 13        | 0  | 0 | 0  | 0   | 0#   | 13         | 0  | 0  | 0  | 0   | 0#   |
| lymphocyte                    | [13]    |    |    |    |     |      | [13]     |    |    |    |     |      | [13]      |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| (Spleen)                      | 0       | 10 | 3  | 0  | 0   | 13   | 0        | 8  | 5  | 0  | 0   | 13   | 0         | 8  | 5 | 0  | 0   | 13   | 0          | 12 | 1  | 0  | 0   | 13   |
| Hematopoiesis, extramedullary | 0       | 11 | 2  | 0  | 0   | 13   | 0        | 5  | 8  | 0  | 0   | 13   | 0         | 7  | 6 | 0  | 0   | 13   | 0          | 2  | 11 | 0  | 0** | 13   |
| Deposit, pigment, brown       | [13]    |    |    |    |     |      | [13]     |    |    |    |     |      | [13]      |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| (Spleen; Berlin blue stain)   | 0       | 4  | 9  | 0  | 0   | 13   | 0        | 4  | 7  | 2  | 0   | 13   | 0         | 2  | 3 | 8  | 0*  | 13   | 0          | 0  | 5  | 7  | 1** | 13   |
| Granules, positive            | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| (Thymus)                      | 12      | 1  | 0  | 0  | 0   | 1    | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Atrophy                       | 12      | 0  | 1  | 0  | 0   | 1    | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Hemorrhage                    | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| (Heart)                       | 12      | 1  | 0  | 0  | 0   | 1    | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Myocardial                    | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| degeneration / fibrosis       | 9       | 2  | 2  | 0  | 0   | 4    | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| (Testis)                      | 11      | 2  | 0  | 0  | 0   | 2    | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Spermatogenesis,              | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| decreased, focal              | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| (Epididymis)                  | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Cell debris, germ cell        | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| (Adrenal gland)               | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Abnormality                   | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| (Urinary bladder)             | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Abnormality                   | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |    |    |     |      | [0]       |    |   |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |

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

[ ], Number of animals examined

\*, Significantly different from control p&lt;0.05 (Mann-Whitney U test)

\*\*, Significantly different from control p&lt;0.01 (Mann-Whitney U test)

#, Significantly different from control p&lt;0.05 (Fisher exact test)

##, Significantly different from control p&lt;0.01 (Fisher exact test)

Table 20

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of macroscopic findings in Fo females

| Group<br>Grade             | Control |   | 40 mg/kg |   | 200 mg/kg |   | 1000 mg/kg |   |
|----------------------------|---------|---|----------|---|-----------|---|------------|---|
|                            | -       | + | -        | + | -         | + | -          | + |
| (Liver)                    | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| dark reddish color         | 13      | 0 | 13       | 0 | 10        | 3 | 8          | 5 |
| pale color/yellowish       | 12      | 1 | 13       | 0 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| granular surface           | 12      | 1 | 13       | 0 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| enlargement                | 12      | 1 | 13       | 0 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| (Kidney)                   | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| pale color                 | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 8          | 5 |
| cyst in                    |         |   |          |   |           |   |            |   |
| cortico-medullary junction | 12      | 1 | 13       | 0 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Spleen)                   | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| small                      | 13      | 0 | 13       | 0 | 12        | 1 | 13         | 0 |
| (Thymus)                   | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| small                      | 10      | 3 | 9        | 4 | 6         | 7 | 8          | 5 |
| black spot                 | 12      | 1 | 13       | 0 | 12        | 1 | 13         | 0 |
| reddish area               | 13      | 0 | 12       | 1 | 10        | 3 | 11         | 2 |
| pale color                 | 13      | 0 | 13       | 0 | 12        | 1 | 12         | 1 |
| (Adrenal glands)           | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| yellowish white area       | 12      | 1 | 13       | 0 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Uterus)                   | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| thickening                 | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| pale colored nodule        | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| (Glandular stomach)        | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| brownish spot on mucosa    | 13      | 0 | 13       | 0 | 12        | 1 | 13         | 0 |

-, Negative; +, Positive

[ ], Number of animals examined

Table 21 - 1

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weights of F<sub>0</sub> females on day 4 of lactation ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound                 | BBTSA                                                         |                                  |                                   |                                   |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Dose group<br>(mg/kg)    | 0 <sup>a)</sup>                                               | 40                               | 200                               | 1000                              |
| Terminal body weight (g) | 302.5 ± 14.1 ( 10)                                            | 308.1 ± 29.3 ( 6)                | 301.5 ± 20.3 ( 13)                | 284.9 ± 34.6 ( 8)                 |
| Liver (g)                | 12.87 ± 1.01 <sup>b)</sup> ( 10)<br>4.26 ± 0.38 <sup>c)</sup> | 13.16 ± 1.49 ( 6)<br>4.27 ± 0.29 | 14.15 ± 2.26 ( 13)<br>4.70 ± 0.67 | 14.59 ± 3.05 ( 8)<br>5.10 ± 0.68* |
| Kidneys (g)              | 2.09 ± 0.24 ( 10)<br>0.69 ± 0.08                              | 2.00 ± 0.28 ( 6)<br>0.65 ± 0.07  | 2.14 ± 0.24 ( 13)<br>0.71 ± 0.07  | 2.09 ± 0.11 ( 8)<br>0.74 ± 0.06   |
| Spleen (g)               | 0.66 ± 0.09 ( 10)<br>0.22 ± 0.03                              | 0.60 ± 0.10 ( 6)<br>0.19 ± 0.01  | 0.56 ± 0.07 ( 13)<br>0.19 ± 0.02  | 0.57 ± 0.11 ( 8)<br>0.20 ± 0.03   |
| Thymus (mg)              | 190.5 ± 49.5 ( 10)<br>62.8 ± 15.0                             | 168.7 ± 39.2 ( 6)<br>55.1 ± 13.4 | 177.5 ± 76.6 ( 13)<br>58.5 ± 24.5 | 154.7 ± 68.4 ( 8)<br>52.6 ± 19.5  |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)<sup>b)</sup>: absolute weight<sup>c)</sup>: relative weight (g or mg per 100g body weight)\* : significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)

Table 21 - 2

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weights of F<sub>0</sub> females ; sacrificed on the way of test period

| Animal<br>no.              | Terminal<br>body weight<br>(g) | Liver           |          | Kidneys         |          | Spleen          |          | Thymus           |          |
|----------------------------|--------------------------------|-----------------|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|------------------|----------|
|                            |                                | Absolute<br>(g) | Relative | Absolute<br>(g) | Relative | Absolute<br>(g) | Relative | Absolute<br>(mg) | Relative |
| Complete implantation loss |                                |                 |          |                 |          |                 |          |                  |          |
| FB02011                    | 281.6                          | 10.60           | 3.76     | 1.87            | 0.66     | 0.79            | 0.28     | 221.8            | 78.8     |
| FB04009                    | 264.4                          | 11.44           | 4.33     | 1.80            | 0.68     | 0.59            | 0.22     | 315.5            | 119.3    |
| Non-pregnant               |                                |                 |          |                 |          |                 |          |                  |          |
| FB01007                    | 307.9                          | 11.20           | 3.64     | 1.91            | 0.62     | 0.68            | 0.22     | 413.7            | 134.4    |
| FB01009                    | 280.2                          | 10.28           | 3.67     | 2.06            | 0.74     | 0.66            | 0.24     | 320.2            | 114.3    |
| FB02002                    | 293.6                          | 10.94           | 3.73     | 2.02            | 0.69     | 0.48            | 0.16     | 378.1            | 128.8    |
| FB02004                    | 292.7                          | 12.07           | 4.12     | 1.98            | 0.68     | 0.53            | 0.18     | 277.7            | 94.9     |
| FB02007                    | 246.9                          | 8.90            | 3.60     | 1.59            | 0.64     | 0.45            | 0.18     | 261.5            | 105.9    |
| FB02012                    | 260.9                          | 9.07            | 3.48     | 1.94            | 0.74     | 0.59            | 0.23     | 418.1            | 160.3    |
| FB02013                    | 302.9                          | 11.70           | 3.86     | 2.00            | 0.66     | 0.54            | 0.18     | 333.3            | 110.0    |
| FB04002                    | 266.0                          | 11.00           | 4.14     | 1.99            | 0.75     | 0.56            | 0.21     | 277.2            | 104.2    |
| FB04004                    | 251.4                          | 10.67           | 4.24     | 1.90            | 0.76     | 0.59            | 0.23     | 315.6            | 125.5    |
| FB04005                    | 252.9                          | 10.64           | 4.21     | 1.95            | 0.77     | 0.65            | 0.26     | 344.6            | 136.3    |
| FB04010                    | 254.8                          | 11.48           | 4.51     | 1.83            | 0.72     | 0.59            | 0.23     | 260.1            | 102.1    |
| Not copulated              |                                |                 |          |                 |          |                 |          |                  |          |
| FB01010                    | 321.6                          | 14.80           | 4.60     | 2.05            | 0.64     | 0.74            | 0.23     | 697.6            | 216.9    |
| FB02010                    | 279.6                          | 10.62           | 3.80     | 1.93            | 0.69     | 0.60            | 0.21     | 483.8            | 173.0    |

Relative: g or mg per 100g body weight

Table 22

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of histopathological findings in Fo females

| Group                         | Control |    |    |    |     |      | 40 mg/kg |    |   |    |     |      | 200 mg/kg |    |    |    |     |      | 1000 mg/kg |    |    |    |     |      |
|-------------------------------|---------|----|----|----|-----|------|----------|----|---|----|-----|------|-----------|----|----|----|-----|------|------------|----|----|----|-----|------|
| Grade                         | -       | ±  | +  | ++ | +++ | Pos. | -        | ±  | + | ++ | +++ | Pos. | -         | ±  | +  | ++ | +++ | Pos. | -          | ±  | +  | ++ | +++ | Pos. |
| (Liver)                       | [13]    |    |    |    |     |      | [13]     |    |   |    |     |      | [13]      |    |    |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Hypertrophy, hepatocyte       |         |    |    |    |     |      |          |    |   |    |     |      |           |    |    |    |     |      |            |    |    |    |     |      |
| centrilobular                 | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13       | 0  | 0 | 0  | 0   | 0    | 9         | 4  | 0  | 0  | 0   | 4#   | 8          | 5  | 0  | 0  | 0   | 5#   |
| Fatty change, periportal      | 8       | 5  | 0  | 0  | 0   | 5    | 4        | 9  | 0 | 0  | 0   | 9    | 11        | 2  | 0  | 0  | 0   | 2    | 12         | 1  | 0  | 0  | 0   | 1    |
| Microgranuloma                | 0       | 13 | 0  | 0  | 0   | 13   | 0        | 11 | 2 | 0  | 0   | 13   | 0         | 13 | 0  | 0  | 0   | 13   | 0          | 12 | 1  | 0  | 0   | 13   |
| Cyst, bile duct               | 12      | 0  | 0  | 1  | 0   | 1    | 13       | 0  | 0 | 0  | 0   | 0    | 13        | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13         | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |
| Cellular infiltration,        |         |    |    |    |     |      |          |    |   |    |     |      |           |    |    |    |     |      |            |    |    |    |     |      |
| lymphocyte                    | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 12       | 1  | 0 | 0  | 0   | 1    | 13        | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13         | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |
| Hematopoiesis, extramedullary | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 12       | 1  | 0 | 0  | 0   | 1    | 13        | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13         | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |
| (Kidney)                      | [13]    |    |    |    |     |      | [13]     |    |   |    |     |      | [13]      |    |    |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Degeneration, vacuolar,       |         |    |    |    |     |      |          |    |   |    |     |      |           |    |    |    |     |      |            |    |    |    |     |      |
| proximal tubule               | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13       | 0  | 0 | 0  | 0   | 0    | 10        | 3  | 0  | 0  | 0   | 3    | 10         | 1  | 2  | 0  | 0   | 3    |
| Basophilic tubule, cortex     | 9       | 3  | 1  | 0  | 0   | 4    | 10       | 3  | 0 | 0  | 0   | 3    | 7         | 6  | 0  | 0  | 0   | 6    | 12         | 1  | 0  | 0  | 0   | 1    |
| Cellular infiltration,        |         |    |    |    |     |      |          |    |   |    |     |      |           |    |    |    |     |      |            |    |    |    |     |      |
| lymphocyte                    | 12      | 1  | 0  | 0  | 0   | 1    | 13       | 0  | 0 | 0  | 0   | 0    | 13        | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 12         | 1  | 0  | 0  | 0   | 1    |
| Cyst, multiple                | 12      | 0  | 0  | 1  | 0   | 1    | 13       | 0  | 0 | 0  | 0   | 0    | 13        | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13         | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |
| Mineralization,               |         |    |    |    |     |      |          |    |   |    |     |      |           |    |    |    |     |      |            |    |    |    |     |      |
| cortico-medullary junction    | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 13       | 0  | 0 | 0  | 0   | 0    | 13        | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    | 12         | 1  | 0  | 0  | 0   | 1    |
| (Spleen)                      | [13]    |    |    |    |     |      | [13]     |    |   |    |     |      | [13]      |    |    |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Hematopoiesis, extramedullary | 0       | 1  | 9  | 3  | 0   | 13   | 0        | 3  | 7 | 3  | 0   | 13   | 0         | 2  | 9  | 2  | 0   | 13   | 0          | 0  | 12 | 1  | 0   | 13   |
| Deposit, pigment, brown       | 0       | 2  | 11 | 0  | 0   | 13   | 0        | 4  | 9 | 0  | 0   | 13   | 0         | 0  | 13 | 0  | 0   | 13   | 0          | 1  | 7  | 5  | 0   | 13   |
| (Spleen; Berlin blue stain)   | [13]    |    |    |    |     |      | [13]     |    |   |    |     |      | [13]      |    |    |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Granules, positive            | 0       | 3  | 7  | 3  | 0   | 13   | 0        | 3  | 5 | 2  | 3   | 13   | 0         | 2  | 9  | 2  | 0   | 13   | 0          | 1  | 6  | 6  | 0   | 13   |
| (Thymus)                      | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |   |    |     |      | [0]       |    |    |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Atrophy                       | 7       | 4  | 1  | 1  | 0   | 6    |          |    |   |    |     |      |           |    |    |    |     |      | 5          | 3  | 4  | 1  | 0   | 8    |
| Hemorrhage                    | 11      | 2  | 0  | 0  | 0   | 2    |          |    |   |    |     |      |           |    |    |    |     |      | 11         | 0  | 1  | 1  | 0   | 2    |
| (Adrenal gland)               | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |   |    |     |      | [0]       |    |    |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Necrosis, cortex              | 12      | 0  | 0  | 1  | 0   | 1    |          |    |   |    |     |      |           |    |    |    |     |      | 12         | 0  | 1  | 0  | 0   | 1    |
| (Heart)                       | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |   |    |     |      | [0]       |    |    |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Abnormality                   | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |          |    |   |    |     |      |           |    |    |    |     |      | 13         | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |
| (Urinary bladder)             | [13]    |    |    |    |     |      | [0]      |    |   |    |     |      | [0]       |    |    |    |     |      | [13]       |    |    |    |     |      |
| Abnormality                   | 13      | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |          |    |   |    |     |      |           |    |    |    |     |      | 13         | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |
| (Ovary)                       | [3]     |    |    |    |     |      | [6]      |    |   |    |     |      | [0]       |    |    |    |     |      | [4]        |    |    |    |     |      |
| Atretic follicle, increased   | 2       | 0  | 1  | 0  | 0   | 1    | 5        | 1  | 0 | 0  | 0   | 1    |           |    |    |    |     |      | 4          | 0  | 0  | 0  | 0   | 0    |

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

[ ], Number of animals examined

#, Significantly different from control p&lt;0.05 (Fisher exact test)

Table 23

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Reproductive performance of animals

| Compound                                             | BBTSA             |                   |                   |                   |
|------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                      | 0 <sup>a)</sup>   | 40                | 200               | 1000              |
| Dose group<br>(mg/kg)                                |                   |                   |                   |                   |
| Number of mated pairs                                | 13                | 13                | 13                | 13                |
| Number of copulated pairs                            | 12                | 12                | 13                | 13                |
| Copulation index A)                                  | 92.3              | 92.3              | 100.0             | 100.0             |
| Number of pregnant animals                           | 10                | 7                 | 13                | 9                 |
| Fertility index B)                                   | 83.3              | 58.3              | 100.0             | 69.2              |
| Pairing days until copulation<br>Mean $\pm$ S.D. (N) | 3.2 $\pm$ 2.1(12) | 2.3 $\pm$ 1.1(12) | 3.7 $\pm$ 1.7(13) | 3.0 $\pm$ 2.8(13) |
| Frequency of vaginal estrus<br>Mean $\pm$ S.D. (N)   | 1.1 $\pm$ 0.3(12) | 1.0 $\pm$ 0.0(12) | 1.2 $\pm$ 0.4(13) | 1.0 $\pm$ 0.0(13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)A): copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs)  $\times$  100; %B): fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs)  $\times$  100; %

Table 24

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of development of F<sub>1</sub> pups up to day 4 of lactation ; mean  $\pm$  S.D.

| Compound<br>Dose group<br>(mg/kg)          | BBTSA                  |                       |                        |                       |
|--------------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|                                            | 0 <sup>a)</sup>        | 40                    | 200                    | 1000                  |
| Number of pregnant females                 | 10                     | 7                     | 13                     | 9                     |
| Number of pregnant females with pups alive | 10                     | 6                     | 13                     | 8                     |
| Gestation index A)                         | 100.0                  | 85.7                  | 100.0                  | 88.9                  |
| Gestation length in days                   | 22.3 $\pm$ 0.5 ( 10 )  | 22.5 $\pm$ 0.5 ( 6 )  | 22.4 $\pm$ 0.5 ( 13 )  | 22.5 $\pm$ 0.5 ( 8 )  |
| Number of corpora lutea                    | 16.5 $\pm$ 2.0 ( 10 )  | 15.9 $\pm$ 2.3 ( 7 )  | 17.2 $\pm$ 2.2 ( 13 )  | 15.7 $\pm$ 2.6 ( 9 )  |
| Number of implantation sites               | 14.0 $\pm$ 4.0 ( 10 )  | 14.0 $\pm$ 5.5 ( 7 )  | 14.5 $\pm$ 5.3 ( 13 )  | 12.8 $\pm$ 5.8 ( 9 )  |
| Implantation index B)                      | 84.3 $\pm$ 19.6 ( 10 ) | 85.7 $\pm$ 31.1 ( 7 ) | 83.0 $\pm$ 26.6 ( 13 ) | 78.5 $\pm$ 30.2 ( 9 ) |
| Day 0 of lactation                         |                        |                       |                        |                       |
| Number of pups born                        | 13.0 $\pm$ 4.1 ( 10 )  | 13.3 $\pm$ 6.0 ( 7 )  | 13.8 $\pm$ 5.2 ( 13 )  | 11.0 $\pm$ 5.8 ( 9 )  |
| Delivery index C)                          | 92.7 $\pm$ 9.0 ( 10 )  | 83.0 $\pm$ 36.7 ( 7 ) | 94.9 $\pm$ 5.6 ( 13 )  | 75.8 $\pm$ 31.5 ( 9 ) |
| Number of live pups                        | 12.9 $\pm$ 4.0 ( 10 )  | 13.1 $\pm$ 5.9 ( 7 )  | 13.5 $\pm$ 4.9 ( 13 )  | 10.9 $\pm$ 5.8 ( 9 )  |
| Birth index D)                             | 92.1 $\pm$ 8.6 ( 10 )  | 82.2 $\pm$ 36.4 ( 7 ) | 93.2 $\pm$ 4.8 ( 13 )  | 75.1 $\pm$ 31.8 ( 9 ) |
| Live birth index E)                        | 99.4 $\pm$ 1.9 ( 10 )  | 99.1 $\pm$ 2.3 ( 6 )  | 98.3 $\pm$ 2.7 ( 13 )  | 98.9 $\pm$ 3.2 ( 8 )  |
| Sex ratio F)                               | 52.7 $\pm$ 14.7 ( 10 ) | 49.2 $\pm$ 9.3 ( 6 )  | 48.9 $\pm$ 7.8 ( 13 )  | 44.3 $\pm$ 10.1 ( 8 ) |
| Day 4 of lactation                         |                        |                       |                        |                       |
| Number of live pups                        | 12.7 $\pm$ 4.1 ( 10 )  | 13.0 $\pm$ 5.9 ( 7 )  | 13.3 $\pm$ 4.8 ( 13 )  | 10.6 $\pm$ 5.5 ( 9 )  |
| Viability index G)                         | 97.8 $\pm$ 5.4 ( 10 )  | 98.8 $\pm$ 2.9 ( 6 )  | 99.1 $\pm$ 2.2 ( 13 )  | 97.8 $\pm$ 6.2 ( 8 )  |
| Sex ratio H)                               | 52.2 $\pm$ 13.9 ( 10 ) | 49.7 $\pm$ 8.9 ( 6 )  | 48.8 $\pm$ 7.8 ( 13 )  | 44.4 $\pm$ 10.0 ( 8 ) |

<sup>a)</sup>: vehicle control : 5 % gum arabic (5 ml/kg)A): gestation index = (number of pregnant females with live pups / number of pregnant females)  $\times$  100; %B): implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea)  $\times$  100; %C): delivery index = (number of pups born / number of implantation sites)  $\times$  100; %D): birth index = (number of live pups on Day 0 / number of implantation sites)  $\times$  100; %E): live birth index = (number of live pups on Day 0 / number of pups born)  $\times$  100; %F): sex ratio = (number of male live pups on Day 0 / number of live pups on Day 0)  $\times$  100; %G): viability index = (number of live pups on Day 4 / number of live pups on Day 0)  $\times$  100; %H): sex ratio = (number of male live pups on Day 4 / number of live pups on Day 4)  $\times$  100; %

Parenthesis indicates the number of litters evaluated



Table 25

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F<sub>1</sub> pups up to day 4 of lactation ; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound               | BBTSA                 |                      |                       |                      |
|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Dose group<br>(mg/kg)  | 0 <sup>a)</sup>       | 40                   | 200                   | 1000                 |
| Day 0 (At birth)       |                       |                      |                       |                      |
| No. of live pups       | 12.9 $\pm$ 4.0 ( 10 ) | 15.3 $\pm$ 1.4 ( 6 ) | 13.5 $\pm$ 4.9 ( 13 ) | 12.3 $\pm$ 4.4 ( 8 ) |
| Male                   | 6.4 $\pm$ 1.7         | 7.5 $\pm$ 1.4        | 6.5 $\pm$ 2.4         | 5.5 $\pm$ 2.8        |
| Female                 | 6.5 $\pm$ 3.5         | 7.8 $\pm$ 1.8        | 7.0 $\pm$ 3.0         | 6.8 $\pm$ 2.5        |
| Weight of pup in grams |                       |                      |                       |                      |
| Male                   | 6.8 $\pm$ 0.9 ( 10 )  | 6.5 $\pm$ 0.3 ( 6 )  | 6.7 $\pm$ 1.0 ( 13 )  | 6.5 $\pm$ 0.9 ( 8 )  |
| Female                 | 6.5 $\pm$ 1.0 ( 10 )  | 6.2 $\pm$ 0.4 ( 5 )  | 6.5 $\pm$ 0.9 ( 13 )  | 6.2 $\pm$ 0.7 ( 8 )  |
| Day 4 after birth      |                       |                      |                       |                      |
| No. of live pups       | 12.7 $\pm$ 4.1 ( 10 ) | 15.2 $\pm$ 1.6 ( 6 ) | 13.3 $\pm$ 4.8 ( 13 ) | 11.9 $\pm$ 4.1 ( 8 ) |
| Male                   | 6.3 $\pm$ 1.9         | 7.5 $\pm$ 1.4        | 6.4 $\pm$ 2.3         | 5.4 $\pm$ 2.8        |
| Female                 | 6.4 $\pm$ 3.3         | 7.7 $\pm$ 1.9        | 6.9 $\pm$ 2.9         | 6.5 $\pm$ 2.1        |
| Weight of pup in grams |                       |                      |                       |                      |
| Male                   | 11.0 $\pm$ 1.8 ( 10 ) | 9.6 $\pm$ 0.8 ( 6 )  | 10.3 $\pm$ 2.6 ( 13 ) | 9.9 $\pm$ 2.0 ( 8 )  |
| Female                 | 10.6 $\pm$ 1.8 ( 10 ) | 9.5 $\pm$ 0.7 ( 6 )  | 9.8 $\pm$ 2.3 ( 13 )  | 9.5 $\pm$ 1.6 ( 8 )  |

<sup>a)</sup> : vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)

Parenthesis indicates the number of litters evaluated

Table 26

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of morphological observation of pups on day 4 of lactation

| Compounds                         | BBTSA           |    |     |      |
|-----------------------------------|-----------------|----|-----|------|
| Dose groups<br>(mg/kg)            | 0 <sup>a)</sup> | 40 | 200 | 1000 |
| No. of pups examined              |                 |    |     |      |
| <u>External observation</u>       | 127             | 91 | 173 | 95   |
| <u>Visceral observation</u>       | 127             | 91 | 173 | 95   |
| No. of pups showing abnormalities |                 |    |     |      |
| <u>External abnormalities</u>     | 0               | 0  | 0   | 0    |
| <u>Visceral abnormalities</u>     |                 |    |     |      |
| Major abnormalities               | 0               | 0  | 0   | 0    |
| Minor abnormalities               | 0               | 0  | 0   | 0    |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)

Table 27

BBTSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of morphological observation of dead pups

| Compounds<br><br>Dose groups<br>(mg/kg) | BBTSA           |    |     |      |
|-----------------------------------------|-----------------|----|-----|------|
|                                         | 0 <sup>a)</sup> | 40 | 200 | 1000 |
| No. of dead pups examined               |                 |    |     |      |
| <u>External observation</u>             | 2               | 2  | 5   | 1    |
| <u>Visceral observation</u>             | 1               | 1  | 5   | 0    |
| No. of dead pups showing abnormalities  |                 |    |     |      |
| <u>External abnormalities</u>           | 0               | 0  | 0   | 0    |
| <u>Visceral abnormalities</u>           |                 |    |     |      |
| Major abnormalities                     | 0               | 0  | 0   | 0    |
| Minor abnormalities                     | 0               | 0  | 0   | 0    |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 5 % gum arabic (5 ml/kg)