### 試 験 報告書

1-メチルエテニルベンゼンの経口投与によるラットの 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

(試験番号: 3 L 3 2 0)

株式会社三菱化学安全科学研究所

# 目次

			頁
要	約	]	1
緒	言		3
方	法	ŧ	
1.	被	験物質	3
2.	試	験動物および飼育条件	3
3.	投	:与量および投与方法	4
4.	群	構成	5
5.	反	復投与毒性に関する観察・検査	5
	1)	一般状態	5
	2)	体重	5
	3)	摂餌量	5
	4)	雄の血液学的検査	5
	5)	雄の臨床化学的検査	6
	6)	病理学的検査	7
6.	生	殖発生毒性に関する観察・検査	7
	1)	生殖機能	7
	2)	分娩・哺育状態	8
	3)	新生児の観察・検査	8
7.	統	計学的解析	9
結	果		
1.	反	復投与毒性	10
	1)	死亡動物	10
	2)	一般状態	10
	3)	体重	10
	4)	摂餌量	10
	5)	雄の血液学的検査	10
	6)	雄の臨床化学的検査	11

7	")器官重量		 11
8	3)剖検所見		 11
ξ	))組織所見		 12
2.	生殖発生毒性	ŧ	 13
1	)生殖機能		 13
2	)分娩・哺育	f状態 ·······	 13
5	) 新生児に及	とばす影響	 13
考察	および結論		 15
文	献		 18

図 表

## 図表

		$\boxtimes$	頁
Fig. 1		体重(雄)	1
Fig. 2		体重(雌)	2
Fig. 3		摂餌量(雄)	3
Fig. 4		摂餌量(雌)	4
		平均值表	
Table	1	一般状態	5
Table	2	体重(雄)	7
Table	3	体重(雌:交配前)	8
Table	4	体重(雌:妊娠期間)	9
Table	5	体重(雌:哺育期間)	10
Table	6	体重増加量(雄)	11
Table	7	体重増加量(雌:交配前)	12
Table	8	体重増加量(雌:妊娠期間)	13
Table	9	体重増加量(雌:哺育期間)	14
Table	10	摂餌量(雄)	15
Table	11	摂餌量(雌:交配前)	16
Table	12	摂餌量(雌:妊娠期間)	17
Table	13	摂餌量(雌:哺育期間)	18
Table	14	血液学的検査(雄)	19
Table	15	白血球百分率(雄)	20
Table	16	臨床化学検査(雄)	21
Table	17	器官重量	23
Table	18	器官重量対体重比	25
Table	19	生殖機能検査	27
Table	20	分娩成績	28
Table	21	生存率	29
Tahle	22	体重(F <sub>1</sub> 動物)	30

Table 23	体重増加量(F <sub>1</sub> 動物)	32
Table 24	剖検所見	34
	組織所見	
Table 26	死亡動物の剖検および組織所見	36

#### 要約

1ーメチルエテニルベンゼンの40、200および1000mg/kgをSD系ラット(Crj:CD)の雌雄に交配前14日間、および交配を経て雄は計43日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育3日までの計41~45日間経口投与し、反復投与による影響および生殖・発生に及ぼす影響を検討した。1群の動物数は雌雄各10匹とし、対照群には溶媒(オリーブ油)のみを投与した。

#### 1) 反復投与毒性

1000mg/kg群において、雄で体重増加抑制および摂餌量減少が認められ、1例が膀胱結石による尿閉で死亡した。雌でも妊娠後期に体重増加抑制の傾向が認められた。病理学的検査では、腎臓の腫大が雌雄で、尿細管上皮の硝子滴の増加と好塩基性変化が雄で、尿細管上皮の空胞化とリンパ球浸潤が雌で、膀胱の結石形成と粘膜上皮の増生が雄で、肝臓の腫大と肝細胞の好酸性変化が雌雄で、副腎束状帯の脂肪滴の増加が雌雄で、胸腺の萎縮が雌で認められた。雄の臨床化学的検査では GPT、尿素窒素、カリウムの上昇およびトリグリセライドの低下が認められた。200mg/kg群においても、雌雄で肝臓および腎臓、雌で胸腺に同様な病理組織学的変化が、雄で GPTの上昇が認められた。雄の血液学的検査では被験物質投与の影響は認められなかった。

#### 2) 生殖発生毒性

親動物の検査において、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、 出産率、分娩率および分娩には被験物質投与に起因する変化は認められなかった。 哺育期間の観察では、1000mg/kg群の母動物 2 例で全新生児死亡が認められた。

新生児の検査において、1000mg/kg群で低体重の傾向および2腹の全新生児死亡に起因する新生児生存率低下の傾向が認められた。出産児数、出産生存児数、性比、出生率、外表、一般状態、出生後の体重増加量および剖検においては被験物質投与の影響は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下における1-メチルエテニルベンゼンの反復投与 毒性に関する無影響量は雌雄とも 40mg/kg、生殖発生毒性に関する無影響量は、親 動物に対して雄が 1000mg/kg、雌が200mg/kg、児動物に対しては200mg/kgと考えられる。

#### 緒 言

1-メチルエテニルベンゼンはABS樹脂の耐熱、耐衝撃性の強化、ポリエステル樹脂、アルキド樹脂の変成などに使用されている。毒性に関する情報として、ラットの経口投与による $LD_{50}$ 値が4900mg/kgであるとの報告がある $^{17}$ 。

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、ラットを用いて1-メチルエテニルベンゼンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施し、生体への一般毒性学的影響および生殖・発生に及ぼす影響について検討したので報告する。

#### 方 法

#### 1. 被験物質

より提供された1-メチルエテニルベンゼン(

Lot 純度99.6%,略称:MEB)を室温・遮光下で保管し、試験に使用した。被験物質は芳香族炭化水素、エタノール、アセトンに可溶で、水には不溶の芳香を有する無色の液体である。なお、本ロットは投与期間中安定であったことが製造者により確認された。

化学名: 1-methylethenylbenzene 化学式: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>

構造式:

$$C H_3$$

$$C = C H_2$$

分子量: 118.18 CAS No.: 98-83-9

#### 2. 試験動物および飼育条件

SD系ラット(Crj:CD, SPF)の雌雄を日本チャールス・リバー株式会社より1993年9月29日に入手し、6日間検疫・馴化後、健康状態が良好なものを試験に供した。投与開始前日に動物を体重別層化無作為抽出法により各群の体重がほぼ均一になるよう群分けした。1群の動物数は雌雄各10匹とし、イヤーパンチにより群および個

体を識別した。投与開始時の週齢は雌雄とも8週齢、体重範囲は雄が309~337g、雌が181~225gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度20~25℃、湿度40~70%R.H.、換気約12回/時、照明12時間/日 (7:00~19:00)に自動調節された飼育室を使用した。

動物は実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー)を敷いたポリカーボネート製ケージ(265W×426D×200Hmm)に、1ケージあたり検疫・馴化期間中は2匹(同性)、投与開始後は1匹、交配期間中は雌雄各1匹、哺育期間は1腹で収容し、スチール製架台上で飼育した。飼育器材は週1回の頻度でオートクレーブ滅菌したものと交換した。

動物には、飼料としてオートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1:オリエンタル酵母工業)を、飲水として $5\mu$ mのフィルター濾過後、紫外線照射した水道水をそれぞれ自由摂取させた。なお、飼料は残留農薬等の汚染物質の分析値が当社の定めた濃度以下であることが保証されたものを使用した。また、飲水については水道法に準拠した水質検査を定期的に行い、その検査値が基準の範囲内であることを確認した。

#### 3. 投与量および投与方法

SD系ラットの雌雄を用いて10日間の反復投与予備試験(用量:0、100、300、1000mg/kg)を行った結果、1000mg/kg群の雄で体重増加抑制および肝臓の腫大傾向が認められた。従って、本試験の高用量には親動物に毒性を示す用量として1000mg/kgを設定し、以下公比5で中用量を200mg/kg、低用量を40mg/kgとした。さらに溶媒(オリーブ油)のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は、雌雄とも交配前14日間、交配期間中、および雄は計画殺前日までの計43日間、雌は交尾成立後分娩を経て哺育3日までの計41~45日間とし、胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与液量は5ml/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

投与液については、各用量毎に被験物質をオリーブ油(丸石製薬, Lot No. 3408) に溶解させ、所定の濃度に調製した。調製はイエローランプ照明下で行った。調製 頻度は週1回とし、投与に供するまで冷蔵・遮光保存した。投与開始前に投与液の 本保存条件下における9日間の安定性を確認した。また、各用量の濃度は設定濃度 に対して97.1~100.3%であった(補足資料参照)。

#### 4. 群構成

<b>ポギm々 々</b>	#¥ &	動物数	枚 (匹)
群略名	群名	雄	雌
A	対 照 群	10	10
В	40mg/kg群	10	10
С	200mg/kg群	10	10
D	1000mg/kg群	10	10
	計	40	40

#### 5. 反復投与毒性に関する観察・検査

#### 1) 一般状態

全例について生死および外観・行動等を投与前および投与後に毎日観察した。死 亡動物は発見後速やかに剖検した。

#### 2) 体 重

雄については投与開始日(投与0日)およびその後毎週1回、雌については投与開始日および交尾成立までは毎週1回、交尾成立後は妊娠0、7、14、20日および哺育0、4日に電子上皿天秤(EB-3200S:島津製作所)を用いて測定した(交尾確認日を妊娠0日、分娩確認日を哺育0日とする)。また、体重増加量を雄については投与0日、雌については交配前は投与0日、妊娠期間は妊娠0日、哺育期間は哺育0日の体重を基準に算出した。

#### 3) 摂餌量

雄については投与開始日から交配期間中を除き毎週1回、雌については交配前は毎週1回、交尾成立後は妊娠0、7、14、20日および哺育0、4日に前記天秤を用いて風袋込み重量を測定し、各期間の摂餌量から1匹あたりの1日の平均摂餌量を算出した。

#### 4) 雄の血液学的検査

雄の全生存動物について、解剖日の前日より約21時間絶食させ、チオペンタール

ナトリウム (ラボナール:田辺製薬)の腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採血し、次の項目を検査した。凝固阻止剤として、EDTA-2Kを用いた。

項目	測 定 / 算 出 法
a) 赤血球数 b) 白血球数 c) 血小板数 d) ヘモグロビン濃度 e) ヘマトクリット値 f) 白血球百分率 g) 網状赤血球数 h) 平均赤血球血色素量(MCH) i) 平均赤血球血色素濃度(MCHC)	シースフローDCインピーダンス検出法 RF/DCインピーダンス検出法 シースフローDCインピーダンス検出法 SLSへモグロビン法 赤血球パルス波高値検出法 Wright染色塗抹標本について測定 アルコンレーサーを用いたフローサイトタトリー法 a)、e)より算出 a)、d)より算出 d)、e)より算出

a)~e)は多項目自動血球分析装置 (NE-4500:東亞医用電子)、f)は血液細胞自動分析装置 (MICROX HEG-70A:立石電機)、g)は自動網赤血球測定装置 (R-2000:東亞医用電子)により測定した。

#### 5) 雄の臨床化学的検査

雄の全生存動物について、解剖日に採取した血液を室温で約30分間放置した後、3000r.p.m. (最大遠心加速度:2050G)で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて次の項目を自動分析装置(日立736-10形:日立製作所)により測定した。

		<u> </u>
	項目	測 定 / 算 出 法
a)	GOT (AST)	UV-Rate法(SSCC改良法)
b)	GPT(ALT)	UV-Rate法(SSCC改良法)
c)	ALP	p-ニトロフェニルリン酸基質法(GSCC改良法)
d)	γ - G T P	$\gamma$ -グルタミル・ $p$ -ニトロフニリド基質法(SSCC改良法
e)	尿素窒素	酵素-UV法(Urease-GLDH法)
f)	グルコース	酵素-UV法(GK-G6PDH法)
g)	総コレステロール	酵素法(CES-CO-POD法)
h)	トリグリセライド	酵素法(LPL-GK-G3PO-POD法)
i)	クレアチニン	Jaffé法
j)	総ビリルビン	Jendrassik改良法
k)	総蛋白	Biuret法
1)	アルブミン	BCG法
m)	A/G比	k)およびl)より算出
n)	カルシウム	O-CPC法
0)	無機リン	UV法
p)	ナトリウム	イオン選択電極法
q)	カリウム	イオン選択電極法
r)	クロライド	イオン選択電極法

#### 6) 病理学的検査

#### (1) 剖 検

雌雄とも最終投与日の翌日に、全生存動物についてチオペンタールナトリウムの 腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ剖検した。

#### (2) 器官重量

投与終了後の剖検時に胸腺、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体の重量を電子上皿 天秤(BD-H60:島津製作所)を用いて測定した。さらに、解剖日の体重を基に対体重 比を算出した。なお、雌の未交尾、非妊娠および非分娩動物については、解剖日が 異なるため測定の対象から除外した。

#### (3) 病理組織学的検査

全生存動物について脳、胸腺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、 卵巣および雄の剖検で異常が認められた膀胱を採取し、10%リン酸緩衝中性ホルマ リン液(精巣および精巣上体はブアン液)にて固定後保存した。

雌雄とも対照および 1000mg/kg群の脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および精巣上体について、また剖検所見あるいは器官重量測定の結果から被験物質投与の影響が疑われた雌雄の膀胱および雌の胸腺について、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、鏡検した。その結果、雌雄の肝臓、腎臓および副腎、雄の膀胱、雌の胸腺に被験物質投与による変化が認められたため、 200および40mg/kg群のこれらの器官についても検査を行った。途中死亡した1000mg/kg群の雄1例については、上記器官の他、精囊、前立腺、肺、胃、十二指腸および尿管を検査した。また、非妊娠雌の卵巣、剖検時に痂皮の認められた 1000mg/kg群の1例の皮膚についても検査した。なお、一部の例の肝臓、腎臓および副腎についてはオイルレッド〇染色を実施した。

#### 6. 生殖発生毒性に関する観察・検査

#### 1) 生殖機能

交配前14日間の投与終了後、各群内で雄1匹対雌1匹の交配対を昼夜同居させ、 毎日午前中に雌の膣垢を採取し、ギムザ染色して鏡検した。膣栓形成あるいは膣垢 標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交尾し た対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。 7日間の交配で各群とも交尾率が90%以上で有意な差が認められなかったため、 交尾能に被験物質投与の影響はないと判断し、以後の交配は行わなかった。この間 に交尾しなかった雌については雄と分離し、着床の有無を確認するため交配終了後 10日間投与した後剖検した。また、雄については他の雄と同様に検査した。

交配結果ならびに雌の妊娠状況から次の項目を算出した。

a) 交尾所要日数:交配後、交尾成立までに要した日数

b) 交尾が成立するまでに逸した発情期の回数

c) 交尾率(%) : (交尾動物数/同居動物数)×100

d) 受胎率(%) : (妊娠動物数/交尾動物数)×100

#### 2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌については全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。また、新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、一般状態、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。なお、午前9時の時点で分娩が終了している動物を 当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。

哺育4日の解剖時に卵巣、子宮を摘出して黄体数および着床数を検査した。交尾確認後25日を経ても分娩しない雌は剖検し、着床の有無を検査した。肉眼的に着床が認められない動物の子宮については、2%KOH水溶液に浸漬し、着床が確認されなければ非妊娠動物とした。これらの検査結果から次の項目を算出した。

a) 妊娠期間 : 妊娠0日から出産が確認された日までの期間

b) 出產率(%):(生存児出產雌数/妊娠雌数)×100

c) 着床率(%) : (着床数/黄体数)×100

d) 分娩率(%) : (総出産児数/着床数)×100

#### 3) 新生児の観察・検査

#### (1) 新生児の検査

哺育 0 日に出産児数、出産生存児数、死産児数、性別および外表異常の有無を検査した。それ以後、一般状態、死亡の有無を毎日観察した。死亡動物は食殺等で検査に耐えないものを除き、10%リン酸緩衝中性ホルマリン液に浸漬・固定後、実体顕微鏡下で剖検した。哺育 0 および 4 日の生存児数から、次の項目を算出した。

a) 出生率(%) : (出産確認時生存児数/総出産児数)×100

b) 新生児生存率(%): (哺育 4 日生存児数/出産確認時生存児数)×100

#### (2) 体 重

哺育0日および4日に1腹毎に雌雄単位でまとめて測定し、それぞれの平均値を 算出した。また、哺育0日の体重を基に4日までの体重増加量を算出した。

#### (3) 剖 検

全ての生存児について哺育4日に口腔を含む外表を検査した後、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ 剖検した。

#### 7. 統計学的解析

計量データはBartlett法による等分散の検定を行い、分散が一様の場合は一元配置分散分析を、一様でない場合はKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合で各群の例数が一定ならば Dunnettの方法、不定ならばSchefféの方法により平均値または順位の多重比較検定を行った。ただし、下記\*印の項目については、はじめにKruskal-Wallisの検定を行い、有意差が認められた場合に順位の多重比較検定を行った。計数データはFisherの直接確率法により検定した。有意水準は5%以下とした。新生児に関するデータについては、各母動物毎に算出した平均値を統計単位とした。なお、非妊娠動物および全新生児が死亡した母動物の体重および摂餌量は集計から除外した。以下に検定の対象となる項目を示す。

#### (1)多重比較検定

体重、体重増加量、摂餌量、血液学的検査、臨床化学的検査、器官重量、 交尾所要日数\*、交尾成立までに逸した発情期の回数\*、妊娠期間\*、 黄体数、着床数、着床率\*、分娩率\*、新生児数、出生率\*、新生児生存率\*、 新生児体重

#### (2)Fisherの直接確率法

交尾率、受胎率、出産率、性比(雄/雌)

#### 結 果

#### 1. 反復投与毒性

#### 1) 死亡動物

1000mg/kg群の雄1例(動物番号:DM07)が投与開始後23日に死亡した。その他に死亡は認められなかった。

#### 2) 一般状態 (Table 1)

投与直後の軽度または中等度の流涎が 1000mg/kg群の雌および200mg/kg以上の群の雄で、投与開始後 3 日以降ほぼ全例に継続して認められた。また、断続的な軽度の流涎は200mg/kg群の雌、 40mg/kg群の雄でも少数例に観察された。これらの動物の一部には投与直前から流涎し始める動物も認められた。 1000mg/kg群の雄の死亡例(DM07)は投与開始後22日に貧血、血尿、自発運動の減少および呼吸緩徐を示し、翌日に死亡した。

その他、偶発性と考えられる所見として、両前肢の脱毛および痂皮が対照群の雄1例、左肩部の外傷および痂皮が1000mg/kg群の雄1例、両前肢の脱毛が200mg/kg群の雌1例に観察された。

#### 3) 体 重 (Fig. 1, 2, Table 2-9)

1000mg/kg群において、雄では投与開始後7日以降終了まで体重増加抑制が認められた。雌では有意差は認められなかったものの、妊娠20日の増加量が若干低値を示し、妊娠後期に体重増加抑制の傾向が認められた。なお、200mg/kg群の哺育4日の体重増加量が有意な高値を示したが、用量との関連がなかったことから、偶発的な変化と判断した。

#### 4) 摂餌量 (Fig. 3, 4, Table 10-13)

1000mg/kg群の雄で投与開始後7日に減少が認められたが、その後は対照群とほぼ同様な推移を示した。雌では交配前、妊娠期間および分娩後とも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 5) 雄の血液学的検査(Table 14, 15)

いずれの検査項目においても対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 6) 雄の臨床化学的検査(Table 16)

GPTの上昇が200mg/kg以上の群で、尿素窒素およびカリウムの上昇、トリグリセライドの低下が 1000mg/kg群で認められた。

その他に、200mg/kg群の総コレステロールが高値を、 1000mg/kg群のグルコース およびクロライドが低値を示したが、用量との関係が不明確か、または生理的変動 範囲内の変化であることから偶発的な変化と判断した。

#### 7) 器官重量 (Table 17, 18)

肝臓の実重量および対体重比の増加が 1000mg/kg群の雄および200mg/kg以上の群の雌で、また腎臓の実重量および対体重比の増加が 1000mg/kg群の雌雄で、対体重比の増加が200mg/kg群の雌で認められた。この他、胸腺の実重量および対体重比の減少が 1000mg/kg群の雌に認められた。

なお、1000mg/kg群の精巣の対体重比が高値を示したが、実重量では対照群と有意な差がなく、また病理組織学的検査および生殖機能検査においても被験物質投与に起因する変化が認められなかったことから、体重増加抑制が反映した見掛け上の変化と判断した。

#### 8) 剖検所見(Table 24, 26)

計画解剖動物において、被験物質投与に起因する変化が肝臓、腎臓、膀胱、副腎および胸腺に認められた。

肝臓では腫大が 1000mg/kg群の雌雄に、暗赤色化が200mg/kg以上の群の雄のみに認められた。

腎臓では両側の腫大が 1000mg/kg群の雌雄に、皮髄境界部の褪色が200mg/kg以上の群の雌のみに認められた。なお、40mg/kg 群の雌1例(B08) にも腫大がみられたが、片側のみであったことから被験物質投与とは無関係と判断した。

膀胱では黄色の微細砂粒状の結石が 1000mg/kg群の雄のみに認められた。

副腎では両側の腫大および灰白色化、胸腺では萎縮がそれぞれ 1000mg/kg群の雌に認められた。胸腺の萎縮が認められた1例(DO3)では、脾臓の萎縮を伴っていた。その他、片側精巣の萎縮が対照群の雄1例(AMO2)、皮膚の痂皮形成が 1000mg/kg

死亡した 1000 mg/kg群の雄の 1 例 (DM07) では、膀胱が血様尿を大量に貯留して膨満し、直径  $1\sim 2$  mm大の膀胱結石が  $7\sim 8$  個認められた。両側腎臓は腫大し、腎盂

群の雄1例(DMO5)に認められたが、その発現状況から偶発病変と判断した。

腔、尿管、膀胱ならびに膀胱に接している精嚢および前立腺に顕著な出血が認められ、尿閉を起こしていたと思われた。その他肺水腫、脾臓の萎縮が認められた。

#### 9) 組織所見(Table 25, 26)

計画解剖動物では、被験物質投与に起因する変化が雌雄の肝臓、腎臓および副腎、雄の膀胱、雌の胸腺に認められた。

肝臓では肝細胞の好酸性変化が200mg/kg以上の群の雌雄に認められた。雄では微細顆粒状を呈した好酸性肝細胞が小葉全体にび漫性に認められ、それに伴って通常みられる脂肪滴が消失していた。一方、雌では小葉中心部に顕著にみられ、肝細胞はやや肥大していた。

腎臓では尿細管上皮の硝子滴の増加が200mg/kg以上の群の雄に認められ、そのほとんどの例が尿細管上皮の好塩基性変化を伴っていた。また、尿細管上皮の空胞化が200mg/kg以上の群の雌に認められ、その周囲にリンパ球の浸潤がみられる例が数例あった。この空胞はオイルレッド〇染色の結果、赤褐色に染まる脂肪滴であった。なお、剖検で腫大が認められた40mg/kg群の雌1例(B08)の腎臓には本変化は認められなかった。

副腎では東状帯の脂肪滴の増加が 1000mg/kg群の雌雄に認められた。東状帯細胞にみられた微細あるいは粗大な脂肪滴は、オイルレッド〇染色陽性を示した。

膀胱では粘膜上皮の増生が 1000mg/kg群の雄に認められ、粘膜上皮層は正常な例の 2~3 倍に肥厚し、びらんと粘膜下織への炎症性細胞の浸潤を伴う例もあった。

胸腺では萎縮が200mg/kg以上の群の雌に認められ、皮質と髄質の境界が不明瞭になっていた。

その他に認められた変化については、いずれも少数例であり、その発現状況から 非特異的な偶発病変と考えられた。なお、非妊娠雌の卵巣には組織学的な変化は認 められなかった。

死亡例では腎臓、尿管、膀胱、精囊および前立腺に出血が見られ、腎臓ではさらに尿細管の拡張および腎乳頭の壊死が認められた。その他肺水腫および脾臓の萎縮も認められた。

#### 2. 生殖発生毒性

#### 1) 生殖機能(Table 19)

非妊娠動物が200mg/kg群で1例、1000mg/kg群で2例認められたが、交尾率および受胎率ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。また、各群ともほとんどの雌が交配開始後4日以内に発情期を示して交尾し、交尾所要日数および交尾成立までに逸した発情期の回数ともに有意な差は認められなかった。なお、対照群の雌1例(A06)は膣垢検査では交尾が確認されなかったが、剖検で妊娠が判明したため、交尾率および受胎率にはこの動物も含めた。

#### 2) 分娩・哺育状態 (Table 20)

非分娩動物が40および200mg/kg群で各1例認められたが、その他の母動物はいずれも正常な分娩を示した。妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩率には、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。なお、非分娩動物には、剖検で子宮内に着床痕のみが観察された。

哺育期間の観察において、1000mg/kg群の2例で哺育1日に全新生児の死亡が観察された。これらの母動物のうち1例(D01)では新生児への授乳量が少なく、翌日には全新生児を食殺していた。また他の1例(D03)では、分娩日の哺育行動には異常はなく、授乳も観察されたが、全新生児が死亡した哺育1日に膣からの出血がみられ、翌日以降は膣と肛門周囲の汚れと哺育4日には自発運動の減少、削瘦、立毛が認められた。なお、この2例のうち1例(D01)は妊娠後期の体重増加抑制が顕著であり、他の1例も分娩後に著しい体重減少を示した。その他の母動物には異常は認められなかった。

#### 3) 新生児に及ぼす影響

#### (1) 生存率(Table 21)

1000mg/kg群では2腹の全新生児が死亡したため、有意差は認められなかったものの、新生児生存率が若干低値を示した。しかし、他の腹では生後の死亡は認められなかった。

出産児数、出産生存児数、性比および出生率には、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### (2) 新生児の観察

いずれの群でも外表異常を示す新生児は認められなかった。生後の一般状態では

200mg/kg群の1例(CO4)で哺育1日に体色の白色化と喘ぎ呼吸が観察されたのみで、 その他の新生児には異常は認められなかった。

#### (3) 体 重 (Table 22, 23)

1000mg/kg群において、哺育 0 日および 4 日の体重が、有意差は認められなかったものの、雌雄とも若干低値を示した。生後の体重増加量については、各被験物質 投与群とも対照群とほぼ同様な値を示した。

#### (4) 剖 検

生存動物では、脳の出血点が40mg/kg群の1例、腎盂拡張が1000mg/kg群の1腹の2例、尿管の拡張が200mg/kg群の1例、1000mg/kg群の1腹の7例に認められた。また、死亡動物では、腎盂拡張が1000mg/kg群の全新生児が死亡した2腹の18例中7例に観察された。

#### 考察および結論

1-メチルエテニルベンゼンの40、200および1000mg/kgをSD系ラットの雌雄に交配前14日間、および交配を経て雄は計43日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育3日までの計41~45日間経口投与し、反復投与による影響および生殖・発生に及ぼす影響について検討した。

#### 1) 反復投与毒性

被験物質の反復投与による影響として、 1000mg/kg群の雄では体重増加抑制、摂餌量減少および膀胱結石が認められ、1例が死亡した。死亡例には貧血および血尿とともに、膀胱に多量の結石と血様尿による膨満が認められたことから、膀胱結石により尿閉を引き起こし死亡したものと推察された。さらに生存動物の剖検でも膀胱に結石が認められていることから、 1000mg/kg群の雄では被験物質投与により尿組成に変化を来たし、結石を形成<sup>2)</sup> したものと考えられる。雌でも妊娠後期に体重増加抑制の傾向が認められたが、死亡および膀胱結石は認められなかった。

腎臓および膀胱への影響として、腎臓では重量増加と病理組織学的変化が200mg/kg以上の群の雌雄で、膀胱では粘膜上皮の増生が 1000mg/kg群の雄で認められた。腎臓の尿細管上皮に認められた硝子滴の増加は雄ラットに特異的な変化であり、炭化水素化合物の投与により生じることが知られている<sup>3.4</sup>。また、硝子滴が過剰に沈着すると上皮は変性・壊死・脱落を生じ、その反応として好塩基性の再生性上皮が出現する<sup>3.4</sup>。本試験においてもこれと同様な一連の変化が認められたことから、他の炭化水素化合物と同様な現象が生じたものと考えられる。また、雄の膀胱において認められた粘膜上皮の増生は、剖検時に認められた結石に起因する上皮の損傷に対する修復像と考えられる<sup>2.5</sup>。雄の臨床化学的検査で認められた尿素窒素およびカリウムの上昇については、膀胱結石による尿路障害、あるいは腎臓の組織変化に伴った機能障害に起因した変化である可能性が考えられる。

肝臓への影響として、雌雄で肝臓重量の増加および病理組織学的変化が、また雄で GPTの上昇が、200mg/kg以上の群で認められた。一般に、本試験で認められた肝 細胞の肥大および好酸性変化は、薬物投与によって薬物代謝酵素の誘導が惹起された際に認められることが知られており、生体の適応現象と考えられている<sup>6,7)</sup>。し

かし、雄では肝臓の脂肪滴の消失および臨床化学的検査でトリグリセライドの低下が認められていることから、肝臓での適応範囲を超えて脂質代謝に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、雌で腎臓の尿細管上皮の脂肪化および雌雄で副腎束状帯の脂肪滴の増加も認められており、これらも脂質代謝への影響に関連した変化<sup>8,9</sup>)と考えられる。

その他、胸腺の萎縮が200mg/kg以上の群の雌で認められた。本変化についてはストレスにより認められる変化でもあり<sup>10)</sup>、本試験の雌では妊娠後期の体重増加抑制に加えて、分娩を経過することにより、動物が過剰なストレス状態にあった可能性が考えられる。

投与直後の流涎が、全被験物質投与群の雄および200mg/kg以上の群の雌で認められたが、一部には投与直前から反射的に発現する例も観察されたことから、被験物質が有する刺激性<sup>1)</sup>あるいは物理的性状に起因したもので、反復投与毒性を示す変化ではないと判断した。

#### 2) 生殖発生毒性

親動物の検査において、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率には、被験物質投与に起因する変化は認められなかった。また、分娩にも異常は認められなかった。よって、被験物質による親動物の生殖機能および分娩への影響はないと考えられる。一方、哺育期間の観察において、1000mg/kg群の母動物2例で全新生児死亡が認められた。これらの母動物には妊娠後期に顕著な体重増加抑制あるいは分娩後に全身状態の悪化がみられ、1例では新生児への授乳量の減少と食殺が認められた。このことから、この2例では顕著な母体毒性により、哺育機能に何らかの障害を来した可能性が考えられる。

新生児の検査において、出産児数、出産生存児数、性比および出生率には被験物質投与の影響は認められなかったが、1000mg/kg群で低体重および新生児生存率低下の傾向が認められた。新生児生存率の低下については、顕著な母体毒性を示した母動物2例の全新生児が死亡したことによるもので、それ以外の新生児には死亡は認められなかった。また、生存し得た新生児の体重はほぼ順調に増加したことから、新生児の死亡は、被験物質の新生児への直接的な影響よりも、母体毒性による二次的な影響である可能性が高いと考えられる。剖検において、1000mg/kg群で腎盂拡張および尿管拡張が観察されたが、腎盂拡張は自然発生的にも認められる所見であ

り、また尿管拡張は1腹のみの発現であったことから、被験物質投与との関連は明らかでなかった。外表および一般状態では被験物質投与に起因する異常は認められなかった。

以上のように、本試験では反復投与による影響として、200mg/kg以上の群で雌雄の腎臓、肝臓および雌の胸腺の病理組織学的変化が、また、1000mg/kg群では雌雄の体重増加抑制、雄の死亡、雄の膀胱および雌雄の副腎の病理組織学的変化が認められた。生殖・発生に及ぼす影響として、親動物の生殖機能および分娩には異常は認められなかったが、1000mg/kg群で母動物の哺育機能および新生児の発育への影響を示唆する変化が認められた。従って、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも40mg/kg、生殖発生毒性に関する無影響量は親動物に対して雄が1000mg/kg、雌が200mg/kg、児動物に対しては200mg/kgと考えられる。

#### 文献

- 1) Wolf, M. A. et al., :Toxicological studies of certain alkylated benzenes and benzene., Arch. Ind. Health, 14, 387-398(1956).
- 2) Gopinath, C. et al., "Atlas of experimental toxicological pathology: The urinary system, Urinary bladder," MTP Press Limited, Lancaster, 1987, pp. 87-90.
- 3) Greaves, P., "Histology of preclinical toxicity studies: Urinary tract, Kidney, Hyaline droplets," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 532-538.
- 4) 渡辺満利,"毒性病理学, 泌尿器系, 非腫瘍性病変, 腎臟(前川昭彦, 林裕造編)," 地人書館, 東京, 1991, pp. 267-293.
- 5) Kunze, E., "Urinary system: Renal Pelvis, Ureters, Urinary bladder, Urethra. Hyperplasia, Urinary bladder, Rat(Jones, T. C. ed.), "Springer-Verlag, Berline, 1986, pp. 291-310.
- 6) Greaves, P., "Histology of preclinical toxicity studies: Digestive sysytem 2, Liver," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 393-441.
- 7) Altmann, H. W., "Drug-induced pathology: Drug-induced liver reactions, A morphological approach II, Adaptative phenomena (Grundmann, E. ed.),"

  Springer-Verlag, Berlin, 1980, pp. 71-76.
- 8) Fitzgerald, J.E. et al.,:Preclinical toxicology studies with the lipid-regulating agent gemcadiol, Fund. Appl. Toxicol., 6,520-531(1986).
- 9) 榎本眞,赤崎兼義,"毒性病理学,内分泌器系病変,"ソフトサイエンス社,東京, 1987, pp. 211-224.
- 10) Gopinath, C. et al., "Atlas of experimental toxicological pathology: The lymphoid system, Thymus," MTP Press Limited, Lancaster, 1987, pp. 122-126.

## 図 表

# 目 次

		$\boxtimes$	負
Fig.	1	体重(雄)	1
Fig.	2	体重(雌)	2
Fig.	3	摂餌量(雄)	3
Fig.	4	摂餌量(雌)	4
		平均值表	
Table	1	一般状態	5
Table	2	体重(雄)	7
Table	3	体重(雌:交配前)	8
Table	4	体重(雌:妊娠期間)	9
Table	5	体重(雌:哺育期間)	10
Table	6	体重増加量(雄)	11
Table	7	体重増加量(雌:交配前)	12
Table	8	体重增加量(雌:妊娠期間)	13
Table	9	体重増加量(雌:哺育期間)	14
Table	10	摂餌量(雄)	15
Table	11	摂餌量(雌:交配前)	16
Table	12	摂餌量(雌:妊娠期間)	17
Table	13	摂餌量(雌:哺育期間)	18
Table	14	血液学的検査(雄)	19
Table	15	白血球百分率(雄)	20
Table	16	臨床化学検査(雄)	21
Table	17	器官重量	23
Table	18	器官重量対体重比	25
Table	19	生殖機能検査	27

Table 20	分娩成績	28
Table 21	生存率	29
Table 22	体重(F <sub>1</sub> 動物) ····································	30
Table 23	体重増加量(F <sub>1</sub> 動物)	32
Table 24	剖検所見	34
Table 25	組織所見	35
Table 26	死亡動物の剖検および組織所見	36

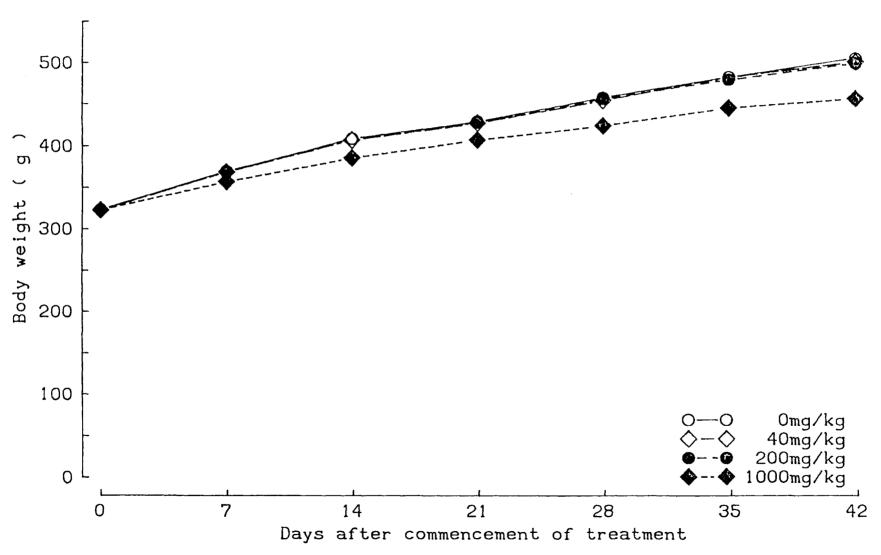


FIG.1 Body weight change of male rats treated with MEB

- 1 -



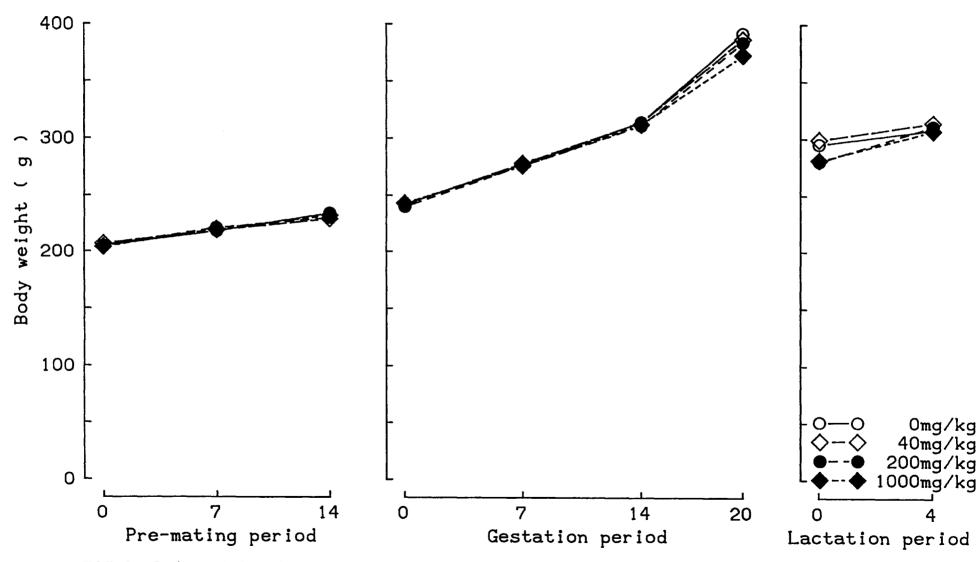


FIG.2 Body weight change of female rats treated with MEB

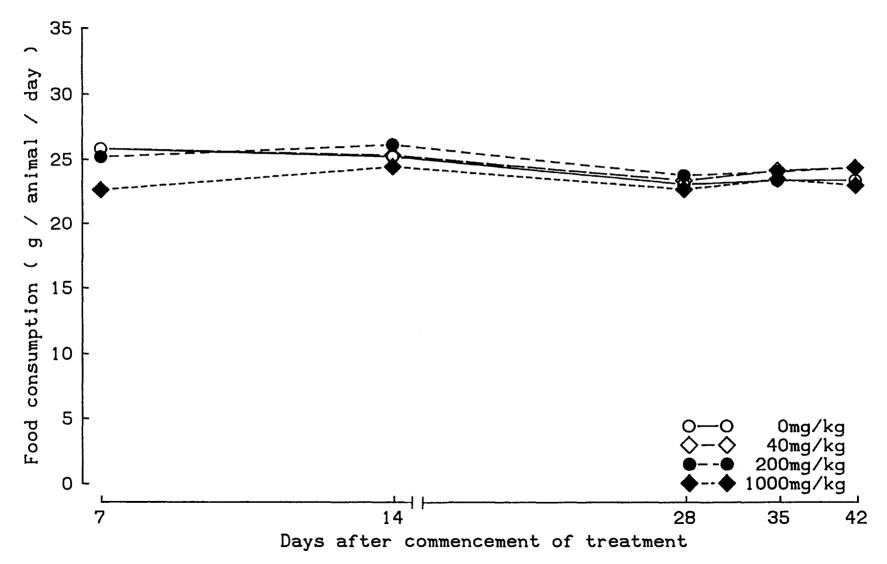


FIG.3 Food consumption change of male rats treated with MEB

- 3 -

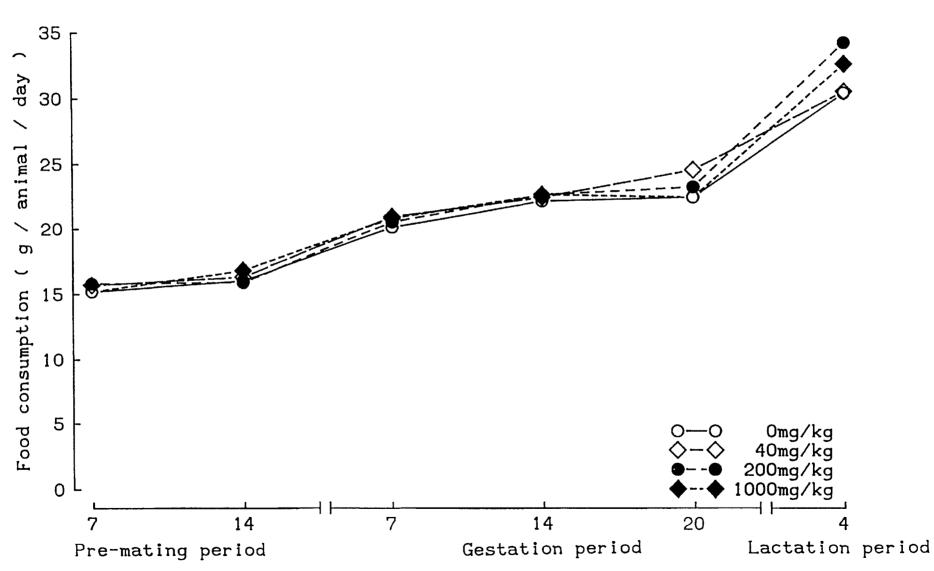


FIG.4 Food consumption change of female rats treated with MEB

\_ 4 -

TABLE 1 - M - 1
CLINICAL SIGNS AFTER TREATMENT
TEST ARTICLES : MEB
SEX : MALE

DOOR LEVEL	PLANTAGE									•						DA	YS	AF?	`ER	CO	MME	NCE	MEN	Τ 0	FT	REA	TME	ENT																			
DOSE LEVEL MG/KG	FINDINGS		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	. 15	5 16	3 1	7 13	8 1	92	0 2	1 2	2 2	23 2	24 3	25	26	27 2	28 5	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	38	4	) 4	1 4	2
	NO. OF ANIMALS	: :	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	) 10	) 10	) 10	) ](	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	) ]	0 1	0 1	0
0	SALIVATION (+)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	) (	) (	) (	) (	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	) (	)	0	0	0
40	NO. OF ANIMALS	; ;	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	) 10	) 10	) ](	) 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	.0 1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	) 10	) 1	0 1	0	0
40	SALIVATION (+)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 0	2	0	1 0	2	2 1	. (	) (	) (	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	1 0	0	0	10	3	1 0	0	0	0	0	1	. ]	l )	0	1	1 0
200	NO. OF ANIMALS	: :	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	) 10	) 10	) ](	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	) ](	) 1	0 1	.0	10
200	SALIVATION (+)		0	0	0	0	1 0	0	2	3	3	2	4	3	3	4	2 3	? ;	3 (	3	5 0	5 0	4	5 1	3	3 1	4	5 1	6	4 3	5 2	7	2	4 2	5 0	4 2	5 1	5 2	6	5 2	5 1	5	5 7	7 )	8	3 2	6
1000	NO. OF ANIMALS	: :	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	) 10	) 1(	) ](	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	ç	9	9 9	9	9	9	9
1000	SALIVATION (+)		0	0	0	3	8	7	7	7	3 6	2 6	9	9	9	5	5 4 5 5	] ]	3 4 7 5	4 5	7 2	7 1	6 3	4 6	5 3	5 4	5 3	6	6 2	4	6 2	8	4	4 3	8	7 1	7	7 2	6	7	8		 3 (	9 0	9	6	5 2

+ , LIGHT ; + , MODERATE.

# TABLE 1 - F - 1 CLINICAL SIGNS AFTER TREATMENT TEST ARTICLES : MEB SEX : FEMALE

	DIND INCO			D	AYS	A	FTE	R (	COM	MEN	CEN	ÆN'	<b>r</b> 0	F	TRE	AT:	MEN	T												Di	AYS	OF	GE	STA	TIC	N								D.	AYS	OF	LA	CT	ATION
DOSE LEVEL MG/KG	FINDINGS		0	1	2	: :	3	4	5	6	7	8	S	1	0 1	1	12	13	14		(	)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	4 1	5 1	16	17	18	19	20		0	1	2	2	3
	NO. OF ANIMALS	:	10	10	10	1	0 1	0	10	10	10	10	10	I	0 1	.0	10	10	10		(	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	<u>(</u>		) (	9	9	9	9	9	9	9		9	9	9	)	9
0	SALIVATION (+) (+)		0	0	0		0	_	0	0	0	0		) 	•	0	0	0	0			) )		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(	) (	) ( ) (	1	0	0	0	0	0	0		0	0	0	)	0
	NO. OF ANIMALS	:	10	10	10	) 1	0 1	0	10	10	10	10	10	1	0 1	.0	10	10	10		10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	) 1(	0 1	0 1	10	10	10	10	10		9	9	9	)	9
40	SALIVATION (+) (+)		•	0	(	•	•	0	0	•	0	•	(	)	0	0	0	0	0			0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	(	) (	) ( ) (	_	0	0	0	0	0	0		•	0		•	0
200	NO. OF ANIMALS	:	10	10	10	) 1	0 1	0	10	10	10	10	10	) 1	0 1	0	10	10	10		ļ	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	(	) (	) !	9	9	9	9	9	9	9		8	8	8	}	8
200	SALIVATION (+) (+)			0	(		0	- 1	0	0	0		(		1	ž	0	0	0	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		Ξ.	0	0	0	0	~	0	0	0	0	0	0	· (	) (		0	0	0	1 0	0	0	0		-	0			*
1000	NO. OF ANIMALS	:	10	10	10	) 1	0	10	10	10	10	10	10	) 1	0	10	10	10	10	,		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	. 8	3 8	3	8	8	8	8	8	8	8		8	8	8	}	8
1000	SALIVATION (+)		0		) (	 ) )	2	3	3	3	4	6	4	 Į	9	7 1	8	9	2	,		1 7	0 7	0	2 6	1 5	2 6	3 5	_	5 3	1 5	7	5				_	3 5	3	4	4 4	3	3			4	_		4 3

- 6 -

<sup>+ ,</sup> SLIGHT ; + , MODERATE.

#### TABLE 2 - M - 1 STUDY NO. 3L320KEO BODY WEIGHT - GROUP MEAN VALUES TEST ARTICLES: MEB

SEX : MALE

UNIT : G DAYS AFTER COMMENCEMENT OF TREATMENT DOSE LEVEL 28 MG/KG 0 7 14 35 21 42 429. O MEAN 323. 370. 409. 458. 483. 505. 7.8 10.6 13.1 19.2 S.D. 22.7 27.4 31.6 N 10 10 10 10 10 10 10 40 MEAN 322. 369. 483. 407. 427. 454. 501. S.D. 6.2 16.9 8.8 13.1 21.6 24.3 31.2 N 10 10 10 10 10 10 10 MEAN 200 322. 369. 409. 428. 456. 480. 499. S.D. 6.2 11.2 19.8 22.3 15.1 25.2 26.3 10 10 10 10 10 N 10 10 1000 MEAN 322. 357. 386. 407. 424. 445. 456. 22.8 S.D. 7.4 12.8 20.0 31.2 32.3 29.4 N 10 10 10 10 9

<sup>\*</sup> SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM CONTROL VALUE , \* , P<0.05 ; \*\* , P<0.01.

STUDY NO. 3L320KEO

TABLE 3 - F - 1
BODY WEIGHT - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES: MEB
SEX: FEMALE

UNIT : G

	_				DAYS AFTER COMMENCEMENT OF TREATMENT
DOSE LEV	EL 	0	7	14	
0	MEAN S.D. N	205. 6.2 10	218. 6.4 10	234. 9.9 10	
40	MEAN S.D. N	207. 7.2 10	219. 8.7 10	229. 10.8 10	
200	MEAN S.D. N	205. 5.6 10	221. 12.0 10	230. 13.7 10	
1000	MEAN S.D. N	204. 12.6 10	220. 12.9 10	232. 13.7 10	

# TABLE 4 BODY WEIGHT - GROUP MEAN VALUES TEST ARTICLES: MEB

UNIT : G DAYS (GESTATION) DOSE LEVEL MG/KG 7 14 20 O MEAN 242. 277. 314. 392. 8.5 12.8 S.D. 15.2 25.8 N MEAN 242. 278. 314. 387. S.D. 12.6 15.8 18.1 32.1 10 10 10 200 MEAN 240. 276. 311. 384. S.D. 13.5 15.4 37.1 19.6 N 9 9 1000 MEAN 243. 276. 312. 373. 16.4 8 S.D. 14.0 18.0 22.2 N 8 8

- 9 -

STUDY NO. 3L320KEO

# TABLE 5 BODY WEIGHT - GROUP MEAN VALUES TEST ARTICLES : MEB

				UNIT : G
DOSE LEVEL MG/KG		0	4	DAYS (LACTATION)
0	MEAN S.D. N	295. 13.2 9	308. 14.1 9	
40	MEAN S.D. N	299. 19.0 9	314. 24.1 9	
200	MEAN S.D. N	280. 18.4 8	311. 18.8 8	
1000	MEAN S.D. N	281. 18.1 8	307. 16.7 6	

- 10 - TABLE 5

TABLE 6 - M - 1
BODY WEIGHT GAIN - GROUP MEAN VALUES

TEST ARTICLES : MEB SEX : MALE

UNIT : G DAYS AFTER COMMENCEMENT OF TREATMENT DOSE LEVEL MG/KG 7 14 21 28 35 42 MEAN 47. 87. 107. 136. 160. 182. 23.4 S.D. 5.8 8.6 15.0 18.8 28.1 10 10 10 N 10 10 10 47. 5.3 40 MEAN 132. 105. 160. 179. 10.3 13.3 18.4 S.D. 21.4 28.3 10 10 N 10 10 10 10 200 MEAN 46. 86. 106. 134. 158. 177. S.D. 6.3 11.0 15.8 18.2 21.0 22.2 N 10 10 10 10 10 10 \*\* 1000 MEAN 34. 85. 102. 134. 63. 122. S.D. 8.0 15.4 27.9 18.7 29.0 26.2 10 10 10 9

<sup>\*</sup> SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM CONTROL VALUE . \* . P<0.05 ; \*\* . P<0.01.

TABLE 7 - F - 1
BODY WEIGHT GAIN - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES: MEB
SEX: FEMALE

					UNIT : G
DOSE LEVI	EL	7	14	DAYS AFTER COMMENCEMENT OF TREATMENT	
0	MEAN S.D. N	13. 4.5 10	29. 7.6 10		
40	MEAN S.D. N	12. 6.4 10	22. 4.4 10		
200	MEAN S.D. N	16. 10.2 10	26. 13.6 10		
1000	MEAN S.D. N	16. 5.7 10	27. 6.7 10		

- 12 -

STUDY NO. 3L320KEO

TABLE 8
BODY WEIGHT GAIN - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES: MEB

UNIT : G

5005 / 54	 				DAYS (GESTATION)
DOSE LEV MG/KG	EL	7	14	20	
0	MEAN S.D. N	35. 7.2 9	72. 8.9 9	150. 18.7 9	
40	MEAN S.D. N	36. 10.6 10	72. 12.6 10	145. 24.7 10	
200	MEAN S.D. N	37. 8.8 9	72. 12.1 9	144. 32.5 9	
1000	MEAN S.D. N	33. 4.5 8	69. 9.5 8	131. 12.9 8	

TABLE 9
BODY WEIGHT GAIN - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES: MEB

					UNIT : G
DOSE LEVI MG/KG	EL	4	DAYS (L	ACTATION)	
0	MEAN S.D. N	13. 13.6 9			
40	MEAN S.D. N	15. 9.1 9			
200	MEAN S.D. N	* 31. 14.0 8			
1000	MEAN S.D. N	22. 10.7 6			

<sup>\*</sup> SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM CONTROL VALUE , \* , P<0.05.

TABLE 10 - M - 1 STUDY NO. 3L320KEO FOOD CONSUMPTION - GROUP MEAN VALUES

TEST ARTICLES : MEB
SEX : MALE

UNIT : G/ANIMAL/DAY DAYS AFTER COMMENCEMENT OF TREATMENT DOSE LEVEL 7 14 28 35 42 MG/KG 25.8 25.2 23.0 23.3 23.3 25.16 2.15 2.50 2.90 2.99 10 10 10 10 10 O MEAN 25.8 S.D. N 1.76 2.11 2.17 2.65 10 10 10 MEAN 25.8 S.D. 1.02 N 10 200 MEAN 25.2 23.7 24.0 24.3 26.1 2.13 10 S.D. 2.17 2.33 2.38 2.18 10 N 10 10 10 24.4 1000 MEAN 22.6 22.6 23.4 22.9 1.09 2.66 2.22 S.D. 1.93 1.94 9 10 N 10

<sup>\*</sup> SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM CONTROL VALUE . \*\* . P<0.01.

TABLE 11 - F - 1
FOOD CONSUMPTION - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES: MEB
SEX: FEMALE

DOSE LEVEL MG/KG	7	14	DAYS AFTER COMMENCEMENT OF TREATMENT
O MEAN	15.2	16.0	
S.D.	0.91	1.06	
N	10	10	

15.7 16.3 1.01 1.53 40 MEAN S.D. 10 N 10 200 MEAN 15.8 15.9 1.46 10 1.15 S.D. 10 N 1000 MEAN 15.2 S.D. 1.44 N 9 16.8 1.65 10

STUDY NO. 3L320KEO

UNIT : G/ANIMAL/DAY

### TABLE 12 FOOD CONSUMPTION - GROUP MEAN VALUES TEST ARTICLES: MEB

UNIT : G/ANIMAL/DAY

DOCE   EVI					DAYS (GESTATION)
DOSE LEVI MG/KG	E.L.	7	14	20	
			<del></del>		·
0	MEAN S.D. N	20.1 1.55 9	22.1 2.05 9	22.4 1.75 9	
40	MEAN S.D. N	20.9 2.27 10	22.4 2.82 10	24.5 2.87 10	
200	MEAN S.D. N	20.2 2.34 9	22.2 2.57 9	23.2 2.84 9	
1000	MEAN S.D. N	20.5 1.85 8	22.7 1.97 8	23.9 1.21 8	

STUDY NO. 3L320KEO

TABLE 13
FOOD CONSUMPTION - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES: MEB

				UNIT : G/ANIMAL/DAY
DOSE LEVE	EL	4	 DAYS (LACTATION)	
0	MEAN S.D. N	30.4 4.04 9		
40	MEAN S.D. N	30.5 3.75 9		
200	MEAN S.D. N	34.2 5.31 8		
1000	MEAN S.D. N	32.6 2.80 6		

- 18 -

## TABLE 14 - FS - M - 1 HEMATOLOGY - GROUP MEAN VALUES TEST ARTICLES : MEB SEX : MALE ANIMALS KILLED ON SCHEDULE ( 6 WEEK)

DOSE LEVE MG/KG	[L	RBC COUNT (× 10 1/4 L)	HT (%)	HB CONC. (G/DL)	RETICULO- CYTE COUNT (%)	MCV (μη <sup>3</sup> )	MCH (PG)	MCHC (%)	PLATELET COUNT (×10 ¼L)
0	MEAN	848.	46.2	15.7	25.	54.5	18.5	33.9	94.8
	S.D.	37.7	2.10	0.65	3.9	1.33	0.49	0.35	23.64
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
40	MEAN	885.	47.4	16.1	24.	53.6	18.2	33.9	97.2
	S.D.	28.6	1.79	0.62	2.7	1.37	0.56	0.28	13.91
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
200	MEAN	848.	46.0	15.6	27.	54.2	18.4	33.8	96.8
	S.D.	40.0	2.07	0.72	2.5	1.01	0.35	0.30	14.15
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
1000	MEAN	865.	45.9	15.6	24.	53.1	18.0	34.0	105.2
	S.D.	24.8	1.41	0.45	2.0	1.67	0.59	0.38	7.77
	N	9	9	9	9	9	9	9	9

TABLE 15 - FS - M - 1
HEMATOLOGY - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES : MEB
SEX : MALE
ANIMALS KILLED ON SCHEDULE ( 6 WEEK)

DOSE LEVE	:1	WBC COUNT		DIFFERENTIAL	COUNT O	F LEUKOCYTES	(% OF	TOTAL COUNTED	CELLS)
MG/KG	.L 	(×10 ½L)	LYMPHO- CYTES	NEUTROP SEGMENTED	HILS BAND	EOSINO- PHILS	BASO- PHILS	MONO- CYTES	
0	MEAN S.D. N	117. 30.0 10	83. 5.7 10	13. 5.4 10	1. 0.7 10	1. 0.7 10	0. 0.0 10	3. 2.5 10	
40	MEAN S.D. N	93. 17.0 10	80. 4.8 10	12. 5.5 10	1. 1.1 10	1.3 10	0. 0.0 10	6. 2.5 10	
200	MEAN S.D. N	112. 26.5 10	81. 6.4 10	10. 1.9 10	0. 0.4 10	1 0.8 10	0. 0.0 10	8. 6.6 10	
1000	MEAN S.D. N	109. 32.7 9	79. 8.9 9	13. 7.0 9	0. 0.7 9	1. 1.1 9	0. 0.0 9	7. 4.7 9	

TABLE 16 - FS - M - 1
CLINICAL CHEMISTRY - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES: MEB
SEX: MALE
ANIMALS KILLED ON SCHEDULE ( 6 WEEK)

DOSE LEV	FL	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	r- GTP	ALP (IU/L)	TOTAL BILIRUBIN (MG/DL)	UREA NITROGEN (MG/DL)	CREATININ (MG/DL)	GLUCOSE (MG/DL)	TOTAL CHOL. (MG/DL)	TRI- GLYCERIDE (MG/DL)	TOTAL PROTEIN (G/DL)	ALBUMIN (G/DL)
0	MEAN S.D. N	85. 22.1 10	22. 4.2 10	0. 0.0 10	239. 37.5 10	0.1 0.06 10	14.0 1.41 10	0.5 0.05 10	144. 13.4 10	71. 12.6 10	85. 39.2 10	6.56 0.330 10	3.74 0.104 10
40	MEAN S.D. N	87. 18.3 10	24. 4.6 10	0. 0.0 10	279. 53.3 10	0.2 0.05 10	15.3 1.83 10	0.5 0.03 10	136. 7.7 10	73. 21.5 10	68. 26.6 10	6.57 0.267 10	3.77 0.125 10
200	MEAN S.D. N	113. 49.9 10	43. 31.8 10	0. 0.0 10	291. 75.9 10	0.1 0.08 10	14.2 1.45 10	0.5 0.05 10	141. 8.9 10	* 95. 15.4 10	56. 17.1 10	6.68 0.142 10	3.76 0.078 10
1000	MEAN S.D. N	99. 29.3 9	** 48. 24.4 9	0. 0.7 9	269. 55.8 9	0.1 0.08 9	18.9 3.63 9	0.5 0.03 9	130. 8.3 9	83. 15.9 9	36. 11.2 9	6.79 0.282 9	3.87 0.217 9

<sup>\*</sup> SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM CONTROL VALUE /\* / P<0.05 ; \*\* / P<0.01 ; \$ / STATISTICAL ANALYSIS IMPOSSIBLE.

TABLE 16 - FS - M - 2
CLINICAL CHEMISTRY - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES: MEB
SEX: MALE
ANIMALS KILLED ON SCHEDULE ( 6 WEEK)

DOSE LEVE	- <b>-</b>	A/G RATIO	CALCIUM	INORGANIC PHOS.	NA (MEO/L)	K	CL
			(MG/DL)	(MG/DL)	(MEQ/L)	(MEQ/L)	(MEQ/L)
0	MEAN	1.34	9.4	7.5	144.	4.4	101.
	S.D.	0.092	0.23	0.43	0.8	0.20	0.8
	N	10	10	10	10	10	10
40	MEAN	1.35	9.5	7.8	144.	4.4	102.
	S.D.	0.098	0.20	0.23	0.9	0.18	1.1
	N	10	10	10	10	10	10
200	MEAN	1.29	9.6	7.6	144.	4.5	100.
	S.D.	0.047	0.24	0.60	1.2	0.13	1.2
	N	10	10	10	10	10	10
1000	MEAN	1.33	9.5	7.8	144.	4.8	100.
	S.D.	0.081	0.19	0.46	0.5	0.14	1.4
	N	9	9	9	9	9	9

<sup>\*</sup> SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM CONTROL VALUE /\* / P<0.05 ; \*\* / P<0.01.

TABLE 17 - FS - M - 1
ORGAN WEIGHT (ABSOLUTE) - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES: MEB
SEX: MALE

DOSE LEV	EL	FINAL BODY	THYMUS	LIVER	KIDNEYS	TESTES E	PIDIDYMIDES
MG/KG 		WEIGHT (G)	(MG)	(G)	(G)	(G)	(G)
0	MEAN	485.	338.	13.28	2.80	3.15	1.18
	S.D.	27.3	72.5	1.756	0.189	0.246	0.110
	N	10	10	10	10	10	10
40	MEAN	482.	342.	13.10	2.89	3.29	1.16
	S.D.	28.2	78.3	1.708	0.289	0.184	0.094
	N	10	10	10	10	10	10
200	MEAN	479.	359.	14.34	3.05	3.40	1.13
	S.D.	24.3	80.5	1.286	0.157	0.211	0.085
	N	10	10	10	10	10	10
1000	MEAN S.D. N	** 435. 30.7 9	378. 90.4 9	** 15.87 1.109 9	3.10 0.158 9	3.34 0.359 9	1.13 0.147 9

<sup>\*</sup> SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM CONTROL VALUE , \* , P<0.05 ; \*\* , P<0.01.

TABLE 17 - FS - F - 1
ORGAN WEIGHT (ABSOLUTE) - GROUP MEAN VALUES
TEST ARTICLES: MEB
SEX: FEMALE

DOGE 1 514		FINAL	TUVMUO		VIDNEVO
DOSE LEVI MG/KG	t L	BODY WEIGHT (G)	THYMUS (MG)	LIVER (G)	KIDNEYS (G)
0	MEAN S.D. N	308. 14.1 9	221. 67.0 9	13.02 1.071 9	1.84 0.131 9
40	MEAN S.D. N	314. 24.1 9	239. 45.7 9	13.61 1.192 9	2.15 0.474 9
200	MEAN S.D. N	311. 18.8 8	181. 36.1 8	15.24 1.017 8	2.17 0.219 8
1000	MEAN S.D. N	291. 38.0 8	139. 48.2 8	** 16.16 2.069 8	2.45 0.191 8

<sup>\*</sup> SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM CONTROL VALUE , \* , P<0.05 ; \*\* , P<0.01.

#### TABLE 18 - FS - M - 1 ORGAN WEIGHT (RELATIVE : PERCENTAGE OF BODY WEIGHT) - GROUP MEAN VALUES TEST ARTICLES : MEB SEX : MALE

DOSE LEVE	EL 	FINAL BODY WEIGHT (G)	THYMUS (× 10 <sup>-3</sup> )	LIVER	KIDNEYS	TESTES E	PIDIDYMIDES
0	MEAN	485.	69.	2.73	0.58	0.65	0.24
	S.D.	27.3	12.0	0.221	0.051	0.073	0.027
	N	10	10	10	10	10	10
40	MEAN	482.	71.	2.71	0.60	0.68	0.24
	S.D.	28.2	14.6	0.215	0.056	0.055	0.029
	N	10	10	10	10	10	10
200	MEAN	479.	75.	2.99	0.64	0.71	0.24
	S.D.	24.3	17.5	0.172	0.036	0.063	0.022
	N	10	10	10	10	10	10
1000	MEAN S.D. N	435. 30.7 9	86. 17.2 9	** 3.66 0.292 9	0.72 0.040 9	** 0.77 0.075 9	0.26 0.033 9

<sup>\*</sup> SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM CONTROL VALUE / \*\* , P<0.01.

### TABLE 18 - FS - F - 1 ORGAN WEIGHT (RELATIVE: PERCENTAGE OF BODY WEIGHT) - GROUP MEAN VALUES TEST ARTICLES: MEB SEX: FEMALE

DOSE LEV	 EL	FINAL BODY WEIGHT (G)	THYMUS (× 10 <sup>-3</sup> )	LIVER	KIDNEYS
0	MEAN S.D. N	308. 14.1 9	72. 21.0 9	4.22 0.248 9	0.60 0.038 9
40	MEAN S.D. N	314. 24.1 9	76. 11.5 9	4.34 0.258 9	0.69 0.157 9
200	MEAN S.D. N	311. 18.8 8	59. 11.6 8	** 4.91 0.283 8	
1000	MEAN S.D. N	291. 38.0 8	* 47. 14.2 8	5.55 0.214 8	0.86 0.168 8

<sup>\*</sup> SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM CONTROL VALUE .\* . P<0.05 ; \*\* . P<0.01.

TABLE 19
REPRODUCTIVE PERFORMANCE - GROUP MEAN VALUES

TEST ARTICLES : MEB

GENERATION : FO

DOSE LEVI	L	NUMBER OF	PRE-CO	)ITAL	COITAL RATE	PREGNANCY RATE	
		PAIRS	DAYS	E.S.	(%)	(%)	
0	MEAN S.D. N	10	2.6 1.13 9	0.0 0.00 9	100.0(10/10)	100.0(10/10	
40	MEAN S.D. N	10	3.3 1.25 10	0.0 0.00 10	100.0(10/10)	100.0(10/10	
200	MEAN S.D. N	10	2.9 0.88 10	0.0 0.00 10	100.0(10/10)	90.0( 9/10	
1000	MEAN S.D. N	10	2.7 1.34 10	0.0 0.00 10	100.0(10/10)	80.0( 8/10	

<sup>1)</sup> DAYS , TIME(DAYS) BETWEEN INITIAL PAIRING AND DETECTION OF COITUS. E.S. , NUMBER OF ESTROUS STAGES(E.S.) BETWEEN INITIAL PAIRING AND DETECTION OF COITUS.

TABLE 20
GESTATION LENGTH AND INDEX - GROUP MEAN VALUES

TEST ARTICLES : MEB

GENERATION: FO

OOSE MG/K	LEVEL G	GESTATION LENGTH (DAYS)	CORPORA Lutea	IMPLANTATION SITES	TOTAL NUMBER OF OFFSPRING	IMPLANTATION INDEX (%)	DELIVERY INDEX (%)	GESTATION INDEX (%)
0	MEAN S. D. N	22. 1 0. 60 9	17.3 2.55 9	15. 9 2. 32 9	14.4 2.92 9	92.0 7.90 9	90. 4 8. 36 9	100.0( 9/ 9)
40	MEAN S.D. N	22. 3 0. 50 9	16.0 1.41 10	13.9 4.65 10	13. 0 4. 85 10	85. 4 27. 99 10	84. 6 30. 15 10	90.0( 9/10)
200	MEAN S. D. N	22.8 0.46 8	18.0 3.12 9	15. 1 5. 53 9	14. 1 5. 73 9	80. 8 28. 48 9	83. 3 31. 85 9	88.9(8/9)
000	MEAN S. D. N	22. 1 0. 35 8	17. 1 1. 73 8	15.6 1.30 8	13. 6 2. 92 8	91. 7 8. 51 8	86. 5 13. 37 8	100.0(8/8)

TABLE 21
VIABILITY INDICES AND LITTER SIZES - GROUP MEAN VALUES

TEST ARTICLES : MEB

GENERATION : F1

DOCE 150	F.	C	BILITY (%) ON DAY AFTER BIRTH		AL NU OFFSP NT BIR	RING	NUME O		NG	NUME O		NG
OSE LEV MG/KG		0	4		F /F)	TOTAL		F /F)	TOTAL		F /F)	TOTAL
0		100.0 0.00 9		2.37	3.16 9	14.4 2.92 9	2.37	3.16 9	14.4 2.92 9	2.37	3.23 9	2.87
40		100.0 0.00 9		2.79	2.00 9	14.4 1.74 9	2.79	2.00 9	14.4 1.74 9	2.65	1.92 9	14.1 1.27 9
200		100.0 0.00 8		1.55	3.12 8	-	1.55	3.12 8	_		2.97 8	15.3 2.19 8
1000		97.7 4.61 8		1.51 8		13.6 2.92 8	1.51 8		13.4 3.07 8	4.8 3.20 8 ( 38	3.69 8	6.65

TABLE 22 BODY WEIGHT - GROUP MEAN VALUES

TABLE 22 STUDY NO. 3L320KEO

TEST ARTICLES : MEB

GENERATION AND SEX : F1 MALE

UNIT : G

DOSE LEV				DAYS AFTER BIRTH
MG/KG		0	4	
0	MEAN S.D. N	6.5 0.57 8	10.6 1.33 9	
40	MEAN S.D. N	6.7 0.60 8	10.7 0.95 9	
200	MEAN S.D. N	6.6 0.65 7	10.1 1.68 8	
1000	MEAN S.D. N	5.7 1.04 8	9.6 1.53 6	

TABLE 22 BODY WEIGHT - GROUP MEAN VALUES

TEST ARTICLES : MEB

GENERATION AND SEX: F1 FEMALE

UNIT : G

DOSE LEV	'EL			DAYS AFTER BIRTH
MG/KG		0	4	
0	MEAN S.D. N	6.1 0.48 8	10.1 1.12 9	
40	MEAN S.D. N	6.2 0.43 8	9.9 0.83 9	
200	MEAN S.D. N	6.1 0.63 7	9.4 1.48 8	
1000	MEAN S.D. N	5.4 0.95 8	9.1 1.54 6	

- 31 - TABLE 22

TABLE 23 BODY WEIGHT GAIN - GROUP MEAN VALUES

STUDY NO. 3L320KEO

TEST ARTICLES : MEB

GENERATION AND SEX : F1 MALE

UNIT : G

DOSE LEVE MG/KG	<del>-</del> EL	4	DAYS AFTER BIRTH	
0	MEAN S.D. N	3.9 0.78 8		
40	MEAN S.D. N	4.0 0.78 8		
200	MEAN S.D. N	3.8 0.90 7		
1000	MEAN S.D. N	3.5 0.75 6		

STUDY NO. 3L320KEO

TABLE 23
BODY WEIGHT GAIN - GROUP MEAN VALUES

TEST ARTICLES : MEB

GENERATION AND SEX : F1 FEMALE

UNIT : G

			UNII • G
DOSE LEVE	iL		DAYS AFTER BIRTH
		4	
0	MEAN S.D. N	3.7 0.51 8	
40	MEAN S.D. N	3.7 0.69 8	
200	MEAN S.D. N	3.6 0.80 7	
1000	MEAN S.D. N	3.4 0.85 6	

Table 24 Necropsy findings Test Articles : MEB

	Sex	:	Mal	е			Fen	nale	
0 -	Dose level(mg/kg)	: 0	40	200	1000	0	40	200	1000
Organ Findings	Number of animals	: 10	10	10	9	10	10	10	10
Liver Dark reddis Enlargement	0	0	3 0	9 1	0 0	0	0	0 1	
Kidneys Discoloration of the cortico- medullary junction		0	0	0	0	0	0	4	9
Enlargement		0	0	0	3	0	1	0	7
Urinary blad Urinary cal		0	0	0	3	0	0	0	0
Adrenals Enlargement Grayish cha		0	0	0	0 0	0	0	0	1
Testes Atrophy		1	0	0	0				
Thymus Atrophy		0	0	0	0	0	0	0	1
Spleen Atrophy		0	0	0	0	0	0	0	1
Skin Crust		0	0	0	1	0	0	0	0

Table 25-1 Histological findings Test Articles : MEB

	Sex :		М	lale			Fem	ale	
0	Dose level(mg/kg):	0	40	200	1000	0	40	200	1000
Organ Findings	Number of animals :	10	10	10	9	10	10	10	10
Heart Focal myoca	rdial degeneration	3	*	*	2	0	*	*	0
	change of the	0	0	7	9	0	0	1	9
hepatocyte Microgranul		1	0	0	0	0	0	0	(
Kidneys									
	hyaline droplets in r epithelium	0	0	3	8	0	0	0	(
	change of the tubular	0	0	2	7	0	0	0	(
	of the tubular	0	0	0	0	0	0	4	10
	n of lymphocytes	0	0	0	0	0	0	0	ć
	tation of renal tubules	0	1	0	1	0	2	0	(
Focal scar		0	1	0	0	0	0	0	(
Nephroblast Pyelectasis		0	0	0	0	0	l 1	0	(

Table 25-2 Histological findings Test Articles : MEB

Se	ex :		 M	ale			Fem	ale	
	ose level(mg/kg) :	0	40	200	1000	0	40	200	1000
Organ Findings Nu	umber of animals :	10	10	10	9	10	10	10	10
Urinary bladder Hyperplasia of epithelium	the mucosal	0	0	0	8	0	*	*	0
Focal erosion Infiltration of cells in submit		0	0	0	2 2	0	*	* *	0
Adrenals Increase of fa fascicular zon	tty droplets in the	0	0	0	6	0	0	0	3
Testes Atrophy of sem	iniferous tubules	2	*	*	2				
Thymus Atrophy		*	*	*	*	0	0	1	5
Spleen Atrophy Extramedullary Hemosiderosis	hemopoiesis	0 0 0	* * *	* * *	0 0 0	0 2 0	* * *	* * *	1 1 1
Skin Focal dermatit	is	*	*	*	1/1#	*	*	*	*

<sup># ,</sup> Number of animals showing lesion / number of animals examined.\* , Not examined.

# Table 26 Individual necropsy and histological findings (Dead animal) Test articles: MEB Sex: Male

sex . mate	
Dose level(mg/kg):	1000
Animal number :	DM07
Organ	Organ
Necropsy findings	Histological findings
Lungs	Lungs
Edema	Pulmonary edema
Kidneys Enlargement (B) Hemorrhage in the renal pelvis (B)	Kidneys Dilatation of the renal tubule (B) Hemorrahge (U) Papillary necrosis (U)
Ureter	Ureter
Hemorrhage	Hemorrhage
Urinary bladder Dilatation Hemorrhage in the mucosa Urinary calculus	Urinary bladder Hemorrhage
Seminal vesicle	Seminal vesicle
Hemorrhage	Hemorrhage
Prostate	Prostate
Hemorrhage	Hemorrhage
Spleen	Spleen
Atrophy	Atrophy