



4-ヒドロキシ安息香酸のラットを  
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 .....                    | 2  |
| 試験材料および方法 .....              | 3  |
| 1. 被験物質 .....                | 3  |
| 2. 使用動物および飼育条件 .....         | 3  |
| 3. 群分けおよび個体識別 .....          | 4  |
| 4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法 ..... | 4  |
| 5. 観察方法 .....                | 5  |
| 6. 統計解析 .....                | 8  |
| 結 果 .....                    | 9  |
| I. 反復投与毒性（親動物所見） .....       | 9  |
| 1. 一般状態 .....                | 9  |
| 2. 体重 .....                  | 9  |
| 3. 飼料消費量 .....               | 10 |
| 4. 解剖時検査所見 .....             | 10 |
| II. 生殖発生毒性 .....             | 14 |
| 1. 生殖学的検査所見 .....            | 14 |
| 2. 産児所見 .....                | 14 |
| 考 察 .....                    | 16 |
| 文 献 .....                    | 18 |

Figures (Figure 1 ~Figure 4)

Tables (Table 1~Table 25)

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、4-ヒドロキシ安息香酸（以下HBA）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、HBAの0（媒体）、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）

死亡動物は、対照群を含むいずれの投与群においても認められなかった。

200 mg/kg 以上のHBA投与により、雌雄ともに、投与後一過性の流涎（時に少数例に鼻汁を伴う）または異常呼吸音が、断続的ではあるが、投与期間を通して観察された。また、雄では、1000 mg/kg のHBA投与により、体重の増加抑制が認められた。雄で実施した血液学的検査および血液生化学的検査の結果から、200 mg/kg 以上のHBA投与によりリンパ球比およびブドウ糖濃度の減少、1000 mg/kg 投与により総蛋白濃度の減少およびA/G比の増加、GPTおよびGOT活性の上昇が認められた。雌の体重、雌雄の飼料消費量、器官重量、剖検および病理組織学的検査では、HBA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

雌雄の交尾率、受胎率、雌動物の妊娠維持、分娩および哺育に関して、HBA投与の影響は認められなかった。

##### 2. 産児所見

産児の生存性、性比、体重および形態にHBA投与の影響は認められなかった。

#### III. 評価

以上の試験成績から、本試験条件下では、HBAの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに40 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、雌雄ともに 1000 mg/kg/day であると判断される。

## 緒 言

HBAは、ベンゼン核の1位に水酸基を、4位にカルボキシル基を有するフェノールカルボン酸であり、染色液、抗菌剤、殺虫剤等の中間代謝物として生成され、刺激性を有する化学物質である<sup>1-3)</sup>。

本化合物については、ラットでのLD<sub>50</sub>値が経口投与では6000 mg/kg、腹腔内投与では340 mg/kgであることが知られている<sup>4, 5)</sup>。また、フェノール酸をラットに短期間投与すると、前胃に乳頭腫または癌を誘発することが報告されているが、HBAを4%含有する餌をラットに9日間与えた結果では、前胃粘膜の変化は観察されていない<sup>6)</sup>。

生殖発生毒性として、HBAの異性体で非ステロイド系抗炎症薬であるサリチル酸およびその誘導体であるアスピリンは、ラット、マウスに対して強い催奇形作用を示すが、HBAをラットの妊娠9日に皮下投与しても、マウスの妊娠9日あるいは妊娠12日に筋肉内投与しても、催奇形作用は確認されていない<sup>7, 8)</sup>。しかし、HBAの長期に亘る反復投与毒性および生殖発生毒性についてはこれまでに報告がない。

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HBA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、同化合物の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

4-ヒドロキシ安息香酸 (HBAと略記) [CAS No. : 99-96-7、分子式 :  $C_7H_6O_3$ 、分子量 : 138.12、英名 : 4-Hydroxybenzoic acid、融点 : 214-217°C] は白色結晶性粉末のフェノールカルボン酸である。

併合試験に使用したHBA [ロット番号 : 純度 : 99.7 wt% (不純物 : サリチル酸 0.02 wt%、4-ヒドロキシイソフタル酸 0.03 wt%)] (Annex 1) は、使用時まで室温保管した。

被験物質は、0.5% CMC Na 水溶液 [カルボキシメチルセルロースナトリウム : 丸石製薬(株)、製造番号1527、日本薬局方注射用水 : 光製薬(株)、製造番号9510AH] に懸濁し、いずれの用量においても1回の投与液量が5 ml/kg 体重になるように濃度を調整した。調製液は、室温、遮光条件下で保管し、調製後8日以内に投与した。なお、調製検体については、室温、遮光条件下で少なくとも8日間安定であることが、併合試験に先立って実施された「4-ヒドロキシ安息香酸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おり (Annex 2)、本試験中 (1995年11月27日) に調製した投与検体には、所定濃度のHBAが均一に含有されていたことを確認した (Annex 3、4)。

### 2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入した日本チャールス・リバー(株)日野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1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、試験に供した。なお、動物の入荷、検疫ならびに群分け時の体重範囲は、Annex 5に示した。

各動物は、温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ および湿度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) 以後の雌動物については、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。なお、供給した飼料、飲料水および床敷には試験に支障

を来す可能性のある混入物は認められなかった。

### 3. 群分けおよび個体識別

雌雄とも初回投与日の体重をもとに、体重別層化無作為抽出法により群分けし、各群とも雌雄各13匹を配した。

群分け後、これらのすべての雌雄動物には、フェルトペンを用いて尾に群および個体番号を記して個体識別した。また、個体識別を容易にする目的で、投与群毎に色彩の異なるカードを各飼育ケージに掛け、これに群および個体番号を記入した。なお、産児については、個体の識別を行わなかった。

### 4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

HBAの投与量は、予備試験の結果を参考に設定した。予備試験では、HBAの0（注射用水）、250、500、1000 mg/kg を雌雄ラット（SD系）に、1日1回、14日間強制的に連続経口投与した。その結果、250 mg/kg 以上のHBA投与により、雌雄動物に、流涎、異常呼吸音あるいは鼻汁が観察され、雄動物では1000 mg/kg、雌動物では250 mg/kg 以上のHBA投与により体重の増加抑制傾向が認められた。さらに、雌動物では1000 mg/kg のHBA投与により、飼料消費量の軽度な減少が認められた。しかし、飼料消費量、尿検査、血液・生化学的検査、器官重量および剖検においては、HBA投与による著しい変化が認められなかったことから、1000 mg/kg は最大耐量を下回る量であると判断し、本試験の高用量に設定した。以下、公比5で減じて中用量には200 mg/kg を、低用量には40 mg/kg を設定した。

なお、本試験では、HBAの懸濁性が注射用水より良好であった0.5%CMC Na 水溶液を媒体として選択し、対照群には0.5%CMC Na 水溶液をHBA投与群と同一条件にて投与した。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   | 媒体(0.5%CMC Na) | 0              | 13 (MX01001～MX01013) | 13 (FB01001～FB01013) |
| 2   | HBA            | 40             | 13 (MX02001～MX02013) | 13 (FB02001～FB02013) |
| 3   | HBA            | 200            | 13 (MX03001～MX03013) | 13 (FB03001～FB03013) |
| 4   | HBA            | 1000           | 13 (MX04001～MX04013) | 13 (FB04001～FB04013) |

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前2週間と交配期間（2週間）および交配期間終了後2週間（剖検日前日までの連続42日間）、また、雌に対しては交配前2週間と最長

2週間の交配期間中（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、午前9時から午後3時の間に行い、各動物の投与液量（5 ml/kg 体重）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回測定した体重をもとに、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。

## 5. 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

雄は全例について、投与1、8、15、22、29、36、42日および解剖日に、雌は全例について、投与1、8、15日に測定し、投与22日まで交尾が確認されなかった雌は、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、分娩した雌では哺育0および4日（解剖日）に体重を測定した。

#### C. 飼料消費量

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飼料消費量を算出した。2週間の交配期間中の餌重量は測定しなかった。交尾成立雌では、妊娠0～7、7～14、14～20日に、分娩した雌では、哺育0～4日の飼料消費量を測定した。

#### D. 交配

交配は、投与15日（投与開始日＝投与1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。交尾の確認は、毎朝、膣栓および膣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。交配の結果から、交尾率 $[(\text{交尾確認動物数} / \text{交配動物数}) \times 100]$ 、受胎率 $[(\text{妊娠動物数} / \text{交尾確認動物数}) \times 100]$ 、同居開始から交尾成立までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

## 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。分娩状態が直接観察できた動物についてはその状態を観察し、直接観察できなかった動物についても、分娩後の徴候から分娩困難や遅延などの分娩障害の有無を判断して記録した。分娩後は哺育状態を毎日観察した。

## F. 分娩日の算定

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終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時を過ぎてから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 $\left[ \left( \text{生児出産雌数} / \text{妊娠動物数} \right) \times 100 \right]$ を各群について求めた。

## G. 最終検査

### a) 雄動物

#### イ. 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、肺、胸腺、精巣および精巣上体の重量を測定した。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、脾臓、副腎、膀胱ならびに剖検において異常を認めた器官は、10%ホルマリン液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。

#### ロ. 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、下記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)                      | "                                                 |
| 血小板数              | " ( " )                        | "                                                 |
| ヘマトクリット値 (Ht)     | 計算 (RBC×MCV×0.001)             |                                                   |
| 平均赤血球血色素量 (MCH)   | " (Hb×1000/RBC)                |                                                   |
| 平均赤血球血色素濃度 (MCHC) | " (Hb×100/Ht)                  |                                                   |
| 白血球分類             | 視算 (静脈血塗抹標本, Wright-Giemsa 染色) | 光学顕微鏡                                             |



# ハ. 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、血漿を分離して下記の項目について検査を行った。

| 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G $\beta$ .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  | パラントロフェリル 酸基質法                           | "                                  |
| GOT活性           | SSCC法                                    | "                                  |
| GPT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         | OCP C法                                   | "                                  |
| 無機リン濃度          | モリブデン酸直接法                                | "                                  |
| $\gamma$ -GTP活性 | $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド<br>基質法 | "                                  |
| 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                                   | "                                  |
| A/G比            | 計算                                       | —                                  |

## b) 雌動物

分娩した動物は哺育4日に、交尾が成立しなかった雌は交配期間終了日に、交尾は確認されたが分娩しなかった雌は妊娠25日相当日に、それぞれ、致死量のペントバルビタール投与後に放血・致死させ、剖検した。その際、卵巢および子宮を摘出し、卵巢は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた後、ブアン液に保存した。子宮は Salewski 法<sup>9)</sup>を応用して着床痕を染色して着床数を確認し、着床率〔(着床数/妊娠黄体数)×100〕を算出した。また、肝臓、腎臓、肺および胸腺の重量を測定し、これらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、子宮、膀胱ならびに剖検時に異常が認められた器官は、10%ホルマリン液に固定して保存した。これらの器官(卵巢および子宮を除く)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。なお、不妊例、交尾不成立例および早期全胚吸収例の卵巢については、病理組織学的検査を実施した。

## 2) 産児

### A. 産児数

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。産児については、外表奇形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

死亡児数を毎日調べ、出生率 $[(\text{出產生児数} / \text{産児数}) \times 100]$  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

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。

## 6. 統計解析

交尾率および受胎率については Yates の補正を含む  $\chi^2$  検定を行った。病理組織所見については、グレード分けしたデータは Mann-Whitney の U 検定<sup>10, 11)</sup> により、陽性グレードの合計値は Fisher 直接確率の片側検定<sup>11)</sup> により、対照群とHBA各投与群との間に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、先ずBartlett法<sup>12)</sup> により各群の分散の一意性について検定した。その結果、分散が一意とされた場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合で、各群の匹数が同一であれば Dunnett法<sup>13)</sup>、同一でない場合は Scheffé 法<sup>14)</sup> を用いて対照群とHBA各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が一意でなかった場合、または分散が0となる群が存在した場合は、Kruskal-Wallis 順位検定<sup>15)</sup> を行い、群間に有意性が認められた場合に、対照群とHBA各投与群との差についてDunnett法あるいはScheffé法の検定を行った。有意水準は、5%および1%とした。

本試験の試験期間中に、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期しえなかった事態の発生および試験計画書からの逸脱はなかった。

## 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）

死亡あるいは瀕死動物は、雌雄とも、いずれの投与群においても認められなかった。一般状態の変化として、雌雄とも、200 mg/kg 以上の投与群において、投与後一過性の流涎、鼻汁あるいは異常呼吸音が観察された。

雄では、流涎が、200 mg/kg 投与群の1例に1回、1000 mg/kg 投与群の全例に3～34回観察され、鼻汁が、1000 mg/kg 投与群の2例に1～2回観察された。また、異常呼吸音が、200 mg/kg 投与群の2例に1～4回、1000 mg/kg 投与群の5例に1回観察された。

雌では、流涎が、1000 mg/kg 投与群の全例に2～23回、鼻汁が、同群の1例に1回観察され、異常呼吸音が、200 mg/kg 投与群の3例に1～2回、1000 mg/kg 投与群の9例に1～10回観察された。

異常呼吸音は、雌雄とも、投与前後に関係なく観察された。また、1000 mg/kg 投与群において認められた一般状態の変化は、断続的ではあるが、投与期間を通して観察された。

### 2. 体重

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

1000 mg/kg 投与群において、体重の増加抑制傾向が認められ、投与1～15日、投与1～22日および投与1～36日の増加量が対照群と比較して統計学的に有意( $p < 0.05$ 、 $0.01$ )に減少した。200 mg/kg 以下の投与群の体重には、対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 2) 雌（Figure 2; Tables 5～10、Appendices 5-1～10-4）

交配前、妊娠期間中および分娩後のいずれの時期の体重にも、対照群とHBA各投与群との間に有意差は認められなかった。

### 3. 飼料消費量

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

投与期間中の飼料消費量には、対照群とHBA各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 2) 雌 (Figure 4; Table 12~14、Appendices 12-1~14-4)

交配前、妊娠期間中および分娩後のいずれの時期の飼料消費量にも、対照群とHBA各投与群との間に有意差は認められなかった。

### 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)

白血球数が、40 および 1000 mg/kg 投与群において対照群と比較して統計学的に有意 ( $p < 0.05$ ,  $0.01$ ) な低値を示した。百分比ではリンパ球比が200 mg/kg 以上の投与群において有意 ( $p < 0.05$ ) に減少し、これに伴い、分葉核好中球比が1000 mg/kg 投与群において有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した。

また、血小板数が200 mg/kg 以上の投与群において、有意 ( $p < 0.01$ ) に減少し、好酸球比が40 mg/kg 投与群において有意 ( $p < 0.01$ ) に増加したが、血小板数および好酸球比の変動の程度は、生理的変動の範囲内であった。

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

1000 mg/kg 投与群において、総蛋白濃度が対照群と比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に減少し、A/G比が有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した。さらに、GPTおよびGOT活性が有意 ( $p < 0.01$ ) に上昇した。また、ブドウ糖濃度が40 mg/kg 以上の投与群において対照群と比較して有意 ( $p < 0.05$ ,  $0.01$ ) に減少した。

無機リン濃度が 200 mg/kg 以上の投与群において、カルシウム濃度が 200 mg /kg 投与群において、それぞれ有意 ( $p < 0.01$ ) に増加したが、無機リン濃度およびカルシウム濃度の変動の程度は生理的変動の範囲内であった。

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

胸腺では、40 および1000 mg/kg 投与群の各1例に小型化が、40 mg/kg 投与群の2例および200 mg/kg 投与群の1例に暗色点（領域）がみられた。

肺では赤色点が、対照群に1例、200 mg/kg 投与群に2例、1000 mg/kg 投与群に3例

みられた。

肝臓では、対照群の2例、40 mg/kg 投与群の4例、200 mg/kg 投与群の4例、1000 mg/kg 投与群の3例に小葉像の明瞭化が、対照群、40 および1000 mg/kg 投与群の各1例に黄色化が、対照群の1例、40 mg/kg 投与群の2例、200 mg/kg 投与群の2例、1000 mg/kg 投与群の1例に黄白色斑が、対照群の1例に暗色域がみられた。

腎臓では、40 mg/kg 投与群の2例、200 mg/kg 投与群の1例に皮質の淡色が、200 mg/kg 投与群の1例に陥凹部が、40 mg/kg 投与群の1例に腎盂拡張がみられた。

脾臓では、40 mg/kg 投与群の1例に嚢胞の形成がみられた。

副腎では、1000 mg/kg 投与群に小型化が1例、また、左側の副腎が腫大し、右側が確認できなかったものが1例みられた。

その他、胃では、40 mg/kg 投与群の1例にヘマチン付着が、1000 mg/kg 投与群の1例では腺胃粘膜が軽度に肥厚し、その部位にポリープ様突起が認められた。

また、精巣および精巣上体の小型化が対照群の2例および200 mg/kg 投与群の1例、前立腺および精嚢の腫大が40 mg/kg 投与群の1例、前立腺のみの腫大が200 mg/kg 投与群に2例、精巣上体の黄白色の結節が40 および1000 mg/kg 投与群に各1例観察された。

しかし、剖検の結果、いずれの器官にもHBA投与に起因したと思われる変化は認められなかった。

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

肝臓、腎臓、肺、胸腺、精巣および精巣上体の重量および比体重値には、対照群とHBA各投与群との間で統計学的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 19-1~19-3)

対照群および 1000 mg/kg 投与群において実施した各器官の病理組織学的検査の結果を以下に示す。

##### (肺)

1000 mg/kg の1例に骨化生がみられた。

##### (肝臓)

対照群および1000 mg/kg 投与群の両群13例全例に門脈周囲性の肝細胞脂肪化および小肉芽腫が観察されたが、両群間に程度の差はなかった。

##### (腎臓)

対照群の6例および1000 mg/kg 投与群の8例に、好塩基性の尿細管が皮質に認められ

たが、両群間に発現頻度および程度の差はなかった。対照群の6例および1000 mg/kg 投与群の1例に eosinophilic body がみられたが、両群間に程度の差はなく、1000 mg/kg 投与群における発現頻度は有意 ( $p<0.05$ ) に減少した。その他、硝子円柱およびリンパ球浸潤が対照群に各1例みられた。

(脾臓)

対照群および1000 mg/kg 投与群の両群13例全例に褐色色素の沈着が、対照群の12例および1000mg/kg 投与群の13例に髄外造血がみられたが、両群間に発現頻度および程度の差はみられなかった。

(その他)

心臓では対照群および1000 mg/kg 投与群の各3例に心筋変性・線維化が、膀胱では対照群および1000 mg/kg 投与群の各1例にリンパ球の浸潤が、精巣では対照群の7例および1000 mg/kg 投与群の3例に限局性の精子形成低下が、精巣上体では対照群および1000 mg/kg 投与群の各1例に精子肉芽腫がみられたが、いずれの所見も両群間に発現頻度および程度の差はみられなかった。また、精巣では対照群のみに4例、多核巨細胞が認められたため、1000 mg/kg 投与群における発現頻度に有意差 ( $p<0.05$ ) がみられた。胸腺、副腎、脳には異常は認められなかった。

B) 雌〔解剖日：哺育4日（出生児生存例および全出生児死亡例）、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)

胸腺では、対照群の2例、40 mg/kg 投与群の5例、200 mg/kg 投与群の2例、1000 mg/kg 投与群の3例に小型化が、40および1000 mg/kg 投与群の各1例に全体的な淡赤色化がみられた。

肺では、40 mg/kg 投与群の1例に暗赤色領域が認められた。

肝臓では、対照群の1例の間膜（肝冠状間膜）に茶褐色の結節が、200 mg/kg 投与群の2例および1000 mg/kg 投与群の1例に小葉像明瞭が、200 mg/kg 投与群の1例に黄色化が、1000 mg/kg 投与群の1例に淡色化が、3例に暗色化がみられた。

腎臓では、1000 mg/kg 投与群の1例に退色が、200 および1000 mg/kg 投与群の各1例に腎盂の拡張がみられた。

その他、対照群に脾臓の小型化あるいは副腎の暗色化が各1例、40 mg/kg 投与群の1

例では下垂体前葉が腫大し、その部位は透明様を呈していた。

しかし、剖検の結果、いずれの器官にもHBA投与に起因したと思われる変化は認められなかった。

(2) 器官重量 (Table 21; Appendices 21-1~21-4)

肝臓、腎臓、肺および胸腺の各器官の重量および比体重値には、対照群とHBA各投与群との間で統計学的有意差は認められなかった。

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

対照群および 1000 mg/kg 投与群において実施した各器官の病理組織学的検査の結果を以下に示す。いずれの所見も両群間に頻度および程度の差はみられなかった。

(胸腺)

対照群の 6 例および1000 mg/kg 投与群の 7 例に萎縮がみられた。

(肺)

対照群の 1 例および1000 mg/kg 投与群の 4 例に炎症巣がみられた。

(肝臓)

対照群および1000 mg/kg 投与群の各 1 例に門脈周囲性の肝細胞脂肪化が、対照群の 4 例および1000 mg/kg 投与群の 1 例に小肉芽腫がみられた。その他、対照群の 2 例に壊死巣が、1 例に肉芽組織が認められた。

(腎臓)

対照群の 4 例および1000 mg/kg 投与群の 6 例に、好塩基性の尿細管が皮質に認められた。その他、1000 mg/kg 投与群の 1 例に腎盂の拡張が見られた。

(脾臓)

対照群および1000 mg/kg 投与群の両群13例全例に褐色色素の沈着が、対照群の13例および1000 mg/kg 投与群の12例に髓外造血がみられた。

(その他)

脳、心臓、副腎、膀胱には異常は認められなかった。また、不妊、未交尾および早期全胚吸収例の雌の卵巣にも、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)

交尾が成立しなかった動物が、200 mg/kg 投与群に 1 組 (動物番号: MX03009×FB03009)、また、交尾はしたが雌が不妊であった動物が、40 mg/kg 投与群に 1 組 (動物番号: MX02009×FB02009)、200 mg/kg 投与群に 3 組 (動物番号: MX03008×FB03008、MX03010×FB03010、MX03011×FB03011) 認められた。しかし、交尾率、受胎率、同居から交尾までに要した日数およびその間の発情回数には、対照群とHBA各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 2) 分娩および哺育状態

いずれの出産動物においても、分娩状態の異常は観察されなかった。1000 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号: FB04002) では、哺育 0 日の生存児が 1 匹であり、哺育 1 日にこの産児は死亡したが、哺育状態の異常は観察されなかった。

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

妊娠動物の黄体数、着床数および着床率に、対照群とHBA各投与群と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)

対照群の 1 例 (動物番号: FB01013) に早期全胚死亡動物が認められたが、それ以外の動物はいずれも出産した。出産率および妊娠期間には対照群とHBA各投与群との間に有意差は認められなかった。

### 2. 産児所見

#### 1) 生存率 (Table 24; Appendices 24-1~24-4)

分娩率、生児出産率、出生率、哺育 4 日までの生存率および性比には、対照群とHBA各投与群との間に有意差は認められなかった。

死亡児 (不明児を含む) は、対照群を含む各投与群に認められたが、総死亡児数にHBAの投与量に依存した変化は観察されず、死亡時期にも一定の傾向は認められなかった。



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

雌雄ともに哺育0および4日の体重には、対照群とHBA各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 形態

哺育0日の生存産児の外表観察では、いずれの産児にも奇形は観察されなかった。また、死亡児の剖検においても異常は観察されなかった。

さらに、哺育4日の出生児の剖検でも、対照群を含むいずれの投与群にも異常は観察されなかった。

雌雄ともに、200 mg/kg 以上のHBA投与により、一過性の流涎（1000 mg/kg 投与群では時に鼻汁を伴う）あるいは異常呼吸音が観察された。剖検では呼吸器系に異常はなく、肺の病理組織学的検査にも形態学的な変化は認められなかったが、流涎および異常呼吸音は予備試験の 250 mg/kg 以上のHBA投与群においても認められた。HBAはモルモットに対して弱い抗原性を示し、人に対しても軽度ではあるがアレルギー機序による発疹、蕁麻疹または気管支の痙攣を引き起こす事が報告されている<sup>16)</sup> ことから、本試験および予備試験で認められた一般状態の変化は、HBA投与の影響と考えられた。

雄動物では、飼料消費量にHBA投与の影響は認められなかったが、1000 mg/kg のHBA投与により、体重の増加抑制が認められた。同群では、血液生化学検査において、総蛋白濃度が減少し、A/G 比が高値を示したことから、グロブリン量の減少が示唆された。また、血液学的検査の結果から、200 mg/kg 以上のHBA投与により、末梢血液中のリンパ球数の減少傾向が認められた。リンパ球およびグロブリンは、免疫応答を担う重要な細胞であるが、剖検および病理組織学的検査では、免疫系に関与する器官である胸腺、脾臓等に異常は認められなかった。しかし、HBAがモルモットに対して抗原性を有し、人においても臨床報告があること<sup>16)</sup>、投与前後に関係なく観察された異常呼吸音を考慮すると、本試験で認められたグロブリン量およびリンパ球数の減少は、HBA投与の影響と考えられた。また、1000 mg/kg のHBA投与により、GOTおよびGPT活性の上昇が認められ、肝機能障害の可能性が示唆された。剖検および病理組織学的検査の結果では、肝臓に形態的異常は認められなかった。しかし、ラット肝ホモジネートを試料とした実験<sup>17)</sup> では、HBAは、メバロン酸の代謝に関与する酵素の活性を抑制させ、コレステロールの合成を阻害させることが報告されていることから、HBAは肝機能障害を惹起させる可能性が示唆され、本試験で認められた酵素活性の上昇は、HBA投与の影響と考えられた。血液生化学的検査から、40 mg/kg 以上の投与群で、ブドウ糖濃度の減少が認められたが、40 mg/kg 投与群における変化は僅かであり、他の検査項目にHBA投与の影響は認められていないことから、毒性学的に意義のない変化と判断した。しかし、200 mg/kg 以上のHBA投与により認められたブドウ糖濃度の減少については、一般状態の変化、体重の増加抑制等が認められていることから、HBA投与による変化と考えられた。また、HBAの200 mg/kg 以上の投与により、無機リン濃度が、HBAの200 mg/kg の投与によりカルシウム濃度が増加したが、いずれの変動も生理

的変動の範囲内であり、さらに、無機リン濃度の増加に明らかなカルシウム濃度の増加およびアルカリフォスファターゼ活性の上昇を伴っていないことから、本試験で認められた無機リン濃度およびカルシウム濃度の変化は、HBA投与の影響ではないと判断した。器官重量については、いずれの測定器官においてもHBA投与による変化は認められなかった。雌動物では、体重、飼料消費量、器官重量、剖検および病理組織学的検査に、HBA投与の影響は認められなかった。

これらのことから、一般毒性学的無影響量は、200 mg/kg 以上のHBA投与により、雌雄ともに一般状態に変化が認められ、さらに雄では、ブドウ糖濃度、グロブリン量およびリンパ球数の減少が認められたことから、雌雄ともに、40 mg/kg/day と判断された。

生殖発生毒性学的検査では、200 mg/kg 投与群に交尾不成立動物が、40 および200 mg/kg 投与群に交尾はしたが妊娠しなかった動物が少数例認められた。交尾不成立であった雄動物では、前立腺が腫大しており、交尾相手雌が不妊であった雄動物4例中1例に精巣および精巣上体の萎縮が、他の1例に前立腺の腫大が認められた。しかし、1000 mg/kg 投与群では雄動物の全例が交尾し、交尾率および妊娠率ならびに生殖器にHBA投与の影響は認められなかったことから、上記の変化はHBA投与の影響ではないと考えられる。

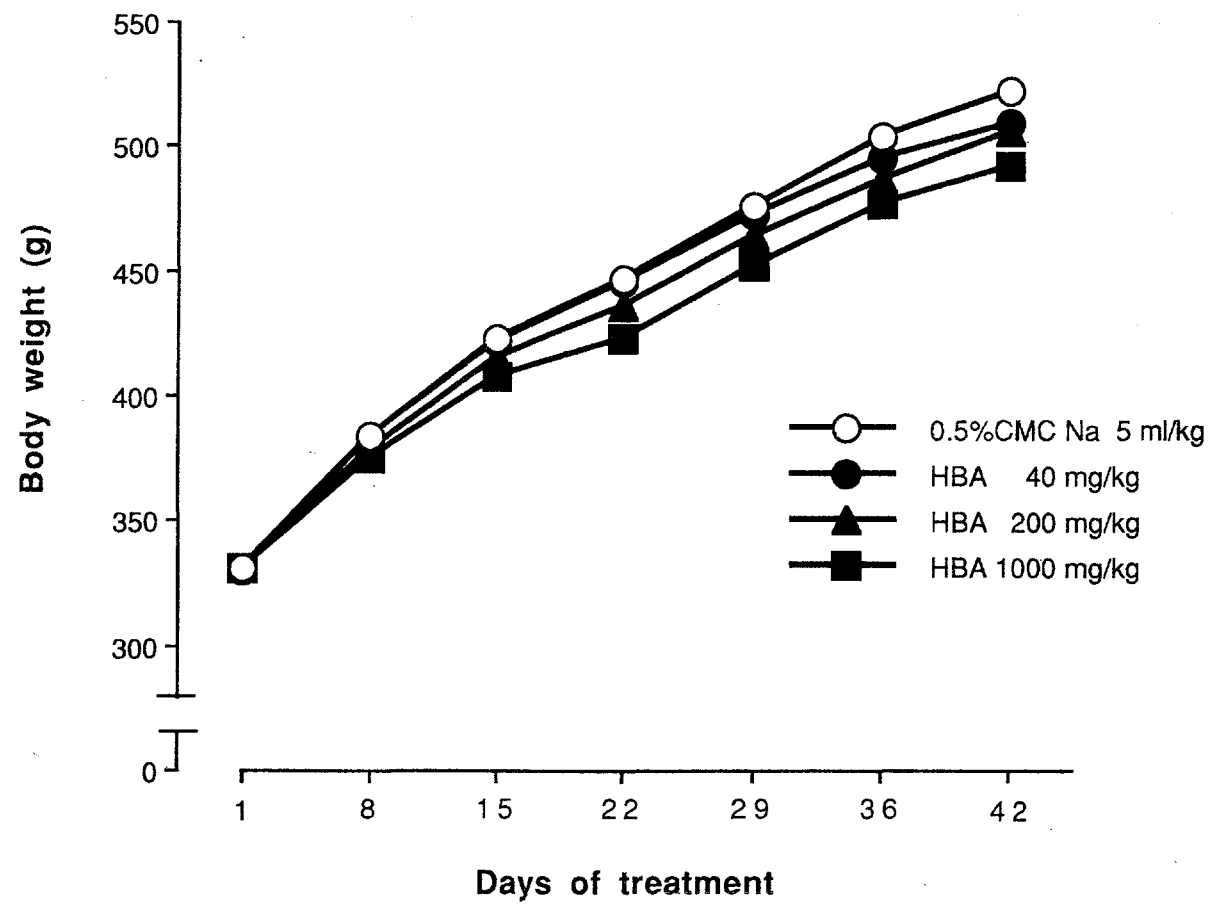
さらに、母動物の妊娠維持、分娩ならびに哺育、産児の生存性、発育および形態にもHBA投与の影響は認められなかった。

これらの結果から、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄ともに、1000 mg/kg/day と判断された。

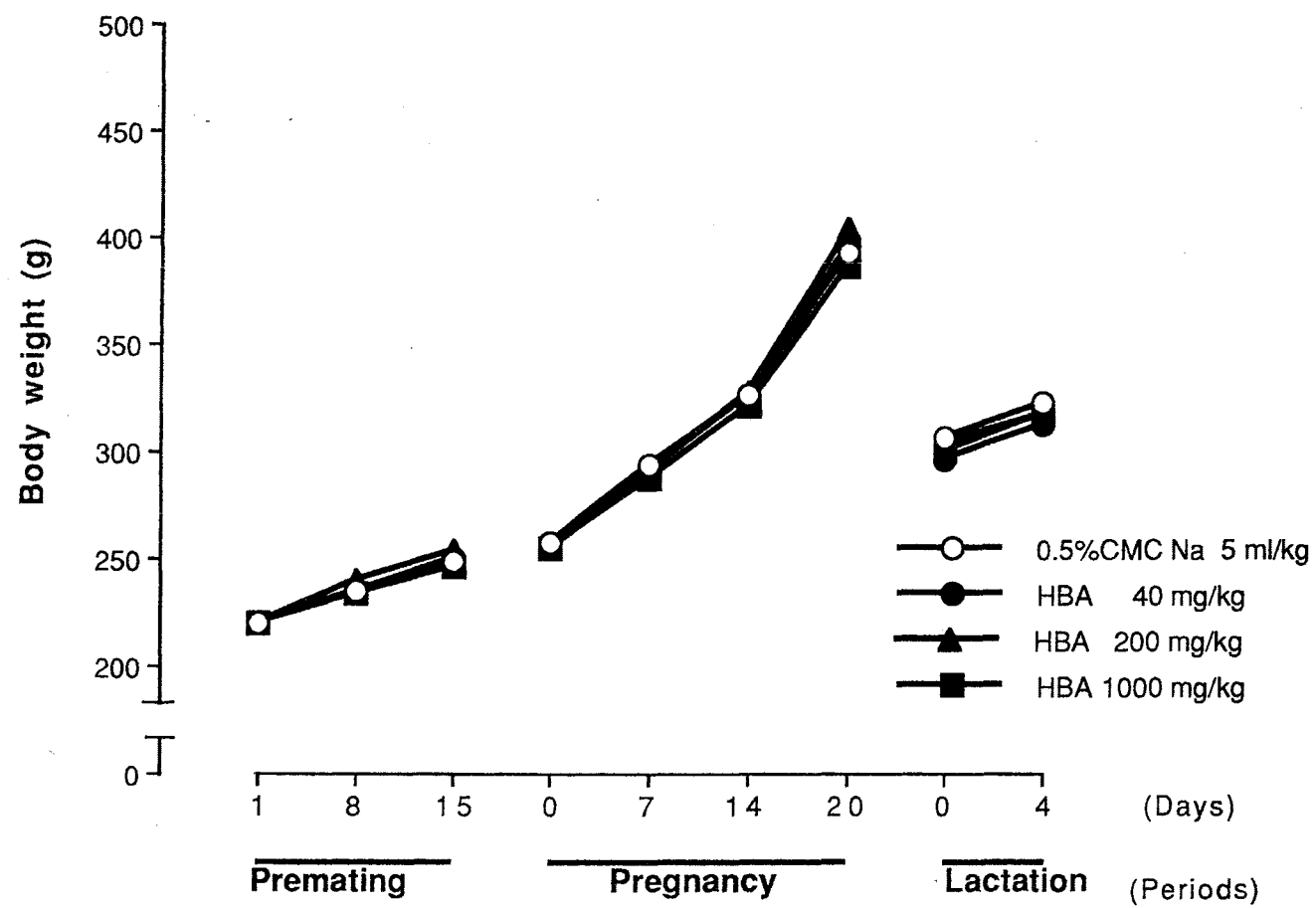
以上の試験成績から、本試験条件下におけるHBAの一般毒性学的な無影響量は、雌雄ともに、40 mg/kg/day、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄ともに、1000 mg/kg/day と判断される。

- 1) The Merck Index. 11th edition, Merck & co., Inc., Rahway, N. J., U. S. A.  
763-764 (1989)
- 2) Kurebayashi, H. et al. : Metabolism and disposition of the flame retardant plasticizer, Tri-p-cresyl phosphate, in the rat.  
Toxicol. App. Pharmacol., 77 : 395-404 (1985)
- 3) Nakagawa, M., Ando, M. : Metabolism of credazine, 3-(2'-Methylphenoxy) pyridazine, in rats. Agric. Biol. Chem., 41(10): 1975-1984 (1977)
- 4) 上野製薬株式会社資料
- 5) Reznichenko, A.K., et al. : Toxicity of parahydroxybenzoic acid, 3,5-dinitrosalicylic acid, orthonitroanisole, 2-hydroxy-1-naphthaldehyde, copper 8-quinolinolate, polyester P2200, and disperison dyes(miscible black, miscible brown, dark-green polyester), 1-nitro-2-carbonic acid, and 1-naphthylamine-5-sulfonic acid. Gig. Sanit., 51(1): 85-86 (1986)
- 6) Rodrigues, C., Lok, E. et al. : Short-term effects of various phenols and acids on the Fischer 344 male forestomach epithelium.  
Toxicology, 38 : 103-117 (1986)
- 7) Larsson, K. S., Boström, H. : Teratogenic action of salicylates related to the inhibition of mucopolysaccharide synthesis.  
Acta paediatrica scandinavica, 54 : 43-48 (1965)

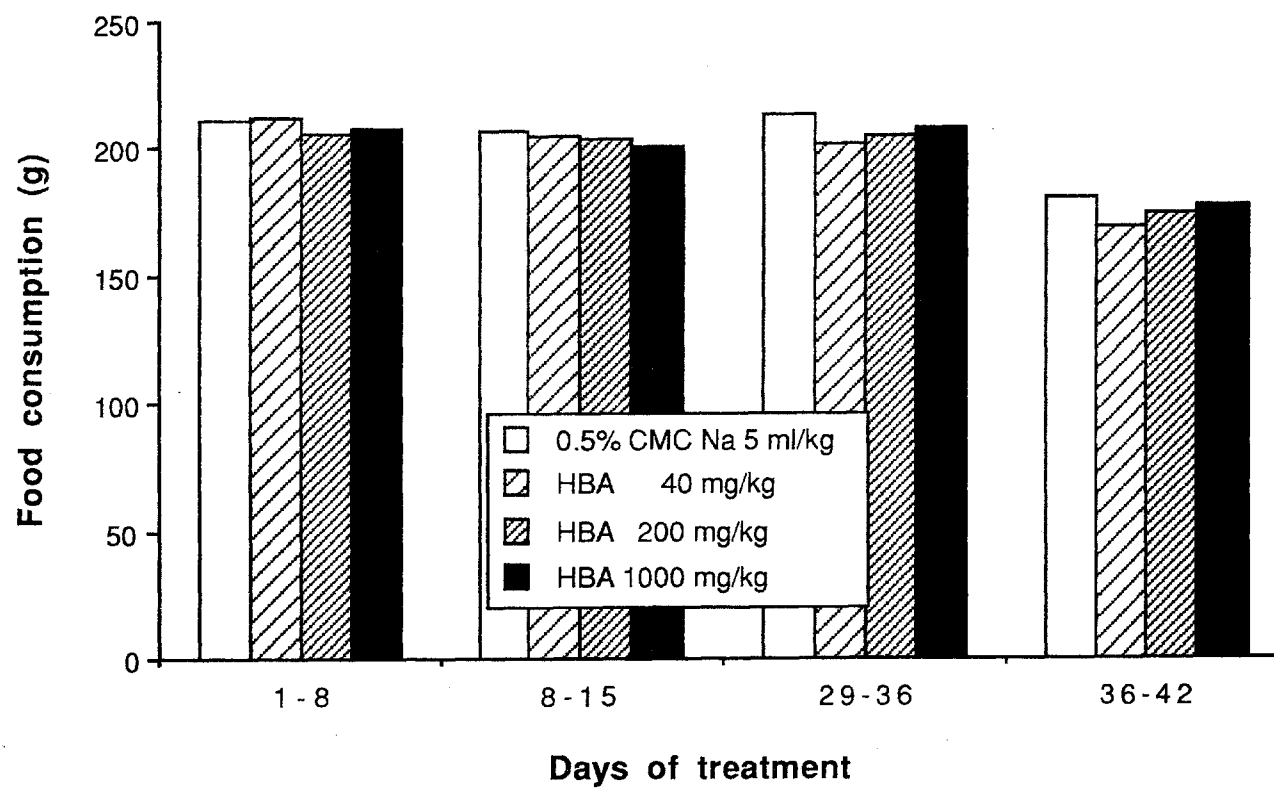
- 8) Koshakji, P. R., Scheulert, A. R. : Biocheminal mechanisms of salicylate teratology in the rat.  
Biochem. Pharmacol., 22 : 407-416 (1973)
- 9) Salewski, E. : Färbemethode zum makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 247: 367 (1964)
- 10) 丹波俊郎 : 「医学への統計学 (古川俊之 監修)」, 朝倉書店. 東京 (1985)
- 11) 石居 進 : 「生物統計学入門」, 倍風館. 東京 (1992)
- 12) 佐久間昭 : 薬効評価—計画と解析、東京大学出版会、東京 (1977)
- 13) Dunnett, C. W. : New tables for multiple comparisons with a control.  
Biometrics, 20: 482-491 (1964)
- 14) Scheffé, H. : A method for judging all contrasts in the analysis of variance.  
Biometrika, 40: 87-104 (1953)
- 15) Kruskal, W. H., Wallis, W. A. : Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Assoc., 47: 583-621 (1952)
- 16) Basketter, D.A., Scholes, E.W. : Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of the range of contact allergen. Fd. Chem. Toxic., 30: 65-69 (1992)
- 17) Shara Bhat, C., Ramasarma, T. : Inhibition of rat liver mevalonate pyrophosphate decarboxylase and mevalonate phosphate kinase by phenyl and phenolic compounds. Biochem. J., 181: 143-151 (1979)



**Fig. 1 Mean body weight of Fo males**

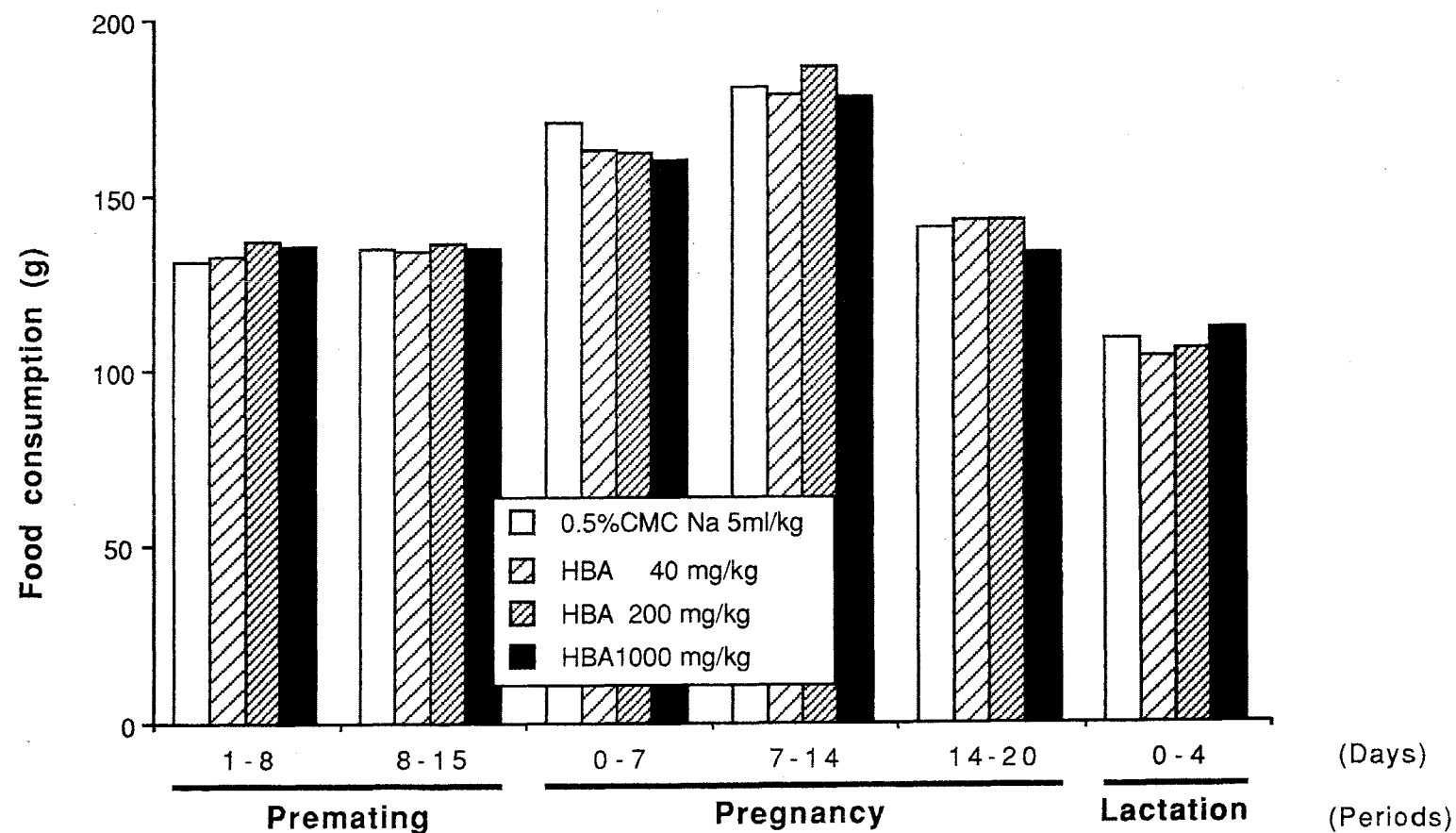


**Fig. 2 Mean body weight of Fo females**



**Fig. 3 Mean food consumption of Fo males**





**Fig.4 Mean food consumption of Fo females**

# 【TABLE INDEX】

HBA: 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 pre mating period                                   |
| 6 ( 6-1 ~ 6-4)           | Body weight gain of F <sub>0</sub> females during pre mating 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 pre mating 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                                          |
| 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 ~19-2)          | Summary of histopathological findings in F <sub>0</sub> males                                    |
| 20 (20-1 ~20-4)          | Summary of macroscopic findings in F <sub>0</sub> females                                        |
| 21 (21-1 ~21-4)          | Absolute and relative organ weight of F <sub>0</sub> females on day 4 of lactation               |
| 22 (22-1 ~22-2)          | Summary of histopathological findings in 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            |

Table 1

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

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

| Clinical signs       | HBA<br>(mg/kg) | Initial number<br>of<br>animals | Number of animals with clinical signs |        |         |         |         |         | Total |
|----------------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|-------|
|                      |                |                                 | Dosing period                         |        |         |         |         |         |       |
|                      |                |                                 | T1~T7                                 | T8~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                                     | 0      | 0       | 0       | 0       | 1       | 1     |
|                      | 1000           | 13                              | 7                                     | 13     | 9       | 11      | 8       | 12      | 13    |
| Rale                 | 0              | 13                              | 0                                     | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                      | 40             | 13                              | 0                                     | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                      | 200            | 13                              | 2                                     | 1      | 0       | 0       | 0       | 0       | 2     |
|                      | 1000           | 13                              | 0                                     | 1      | 1       | 1       | 1       | 1       | 5     |
| Rhinorrhea           | 0              | 13                              | 0                                     | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                      | 40             | 13                              | 0                                     | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                      | 200            | 13                              | 0                                     | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                      | 1000           | 13                              | 1                                     | 0      | 0       | 1       | 0       | 1       | 2     |

T: treatment days

Table 2

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

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

| Clinical signs       | HBA<br>(mg/kg) | Initial number<br>of<br>animals | Number of animals with clinical signs |        |         |         |         |         |                |                |                |                |                |       |
|----------------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
|                      |                |                                 | Dosing period                         |        |         |         |         |         |                |                |                |                |                | Total |
|                      |                |                                 | T1~T7                                 | T8~T14 | T15~T21 | T22~T28 | T29~T35 | T36~T45 | L <sub>0</sub> | L <sub>1</sub> | L <sub>2</sub> | L <sub>3</sub> | L <sub>4</sub> |       |
| 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      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0     |
|                      | 1000           | 13                              | 8                                     | 11     | 13      | 9       | 11      | 7       | 3              | 0              | 4              | 4              | 0              | 13    |
| Rale                 | 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*                             | 2                                     | 1      | 0       | 1       | 0       | 0       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 3     |
|                      | 1000           | 13                              | 3                                     | 4      | 5       | 2       | 1       | 1       | 0              | 0              | 1              | 1              | 0              | 9     |
| Rhinorrhea           | 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      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0     |
|                      | 1000           | 13                              | 0                                     | 0      | 0       | 1       | 0       | 0       | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 1     |

T: treatment days

L: lactational days

\*: One female rat was sacrificed on day 29 of treatment, the last day of the mating period (Not copulated).

Table 3

HBA: 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              | HBA                |                    |                    |                    |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                 | 200                | 1000               |
| Days of treatment     |                    |                    |                    |                    |
| 1 (Initial weight)    | 331.1 ± 11.1 ( 13) | 330.2 ± 11.7 ( 13) | 330.7 ± 12.4 ( 13) | 331.2 ± 11.1 ( 13) |
| 8                     | 384.3 ± 18.2 ( 13) | 384.0 ± 15.0 ( 13) | 377.9 ± 23.4 ( 13) | 375.1 ± 14.6 ( 13) |
| 15                    | 423.2 ± 24.2 ( 13) | 421.2 ± 21.7 ( 13) | 414.8 ± 24.3 ( 13) | 407.4 ± 20.3 ( 13) |
| 22                    | 446.9 ± 25.4 ( 13) | 445.4 ± 24.8 ( 13) | 436.1 ± 28.8 ( 13) | 422.6 ± 23.1 ( 13) |
| 29                    | 475.5 ± 30.6 ( 13) | 472.2 ± 28.6 ( 13) | 463.8 ± 33.6 ( 13) | 452.2 ± 26.7 ( 13) |
| 36                    | 503.8 ± 30.0 ( 13) | 495.2 ± 32.6 ( 13) | 486.6 ± 37.6 ( 13) | 476.9 ± 27.7 ( 13) |
| 42                    | 522.0 ± 36.6 ( 13) | 509.4 ± 37.1 ( 13) | 505.6 ± 37.7 ( 13) | 491.4 ± 31.9 ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)

Table 4

HBA: 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              | HBA                |                    |                    |                     |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                 | 200                | 1000                |
| Days of treatment     |                    |                    |                    |                     |
| 1 ~ 8                 | 53.1 ± 9.0 ( 13)   | 53.8 ± 7.9 ( 13)   | 47.2 ± 14.1 ( 13)  | 43.9 ± 9.6 ( 13)    |
| 8 ~ 15                | 38.9 ± 7.6 ( 13)   | 37.2 ± 8.5 ( 13)   | 36.9 ± 8.6 ( 13)   | 32.4 ± 7.6 ( 13)    |
| 15 ~ 22               | 23.7 ± 5.9 ( 13)   | 24.2 ± 7.3 ( 13)   | 21.3 ± 6.2 ( 13)   | 15.1 ± 14.2 ( 13)   |
| 22 ~ 29               | 28.6 ± 7.9 ( 13)   | 26.8 ± 6.0 ( 13)   | 27.7 ± 7.3 ( 13)   | 29.7 ± 6.2 ( 13)    |
| 29 ~ 36               | 28.3 ± 4.9 ( 13)   | 23.0 ± 7.8 ( 13)   | 22.8 ± 5.7 ( 13)   | 24.7 ± 5.7 ( 13)    |
| 36 ~ 42               | 18.2 ± 10.4 ( 13)  | 14.3 ± 9.4 ( 13)   | 19.0 ± 3.2 ( 13)   | 14.5 ± 6.2 ( 13)    |
| <hr/>                 |                    |                    |                    |                     |
| 1 ~ 15                | 92.0 ± 15.5 ( 13)  | 91.0 ± 14.8 ( 13)  | 84.1 ± 14.3 ( 13)  | 76.3 ± 14.4* ( 13)  |
| 1 ~ 22                | 115.7 ± 17.7 ( 13) | 115.2 ± 19.7 ( 13) | 105.4 ± 19.3 ( 13) | 91.4 ± 19.8** ( 13) |
| 1 ~ 29                | 144.4 ± 22.2 ( 13) | 142.0 ± 22.1 ( 13) | 133.1 ± 24.4 ( 13) | 121.1 ± 22.5 ( 13)  |
| 1 ~ 36                | 172.7 ± 21.4 ( 13) | 164.9 ± 26.8 ( 13) | 155.9 ± 28.1 ( 13) | 145.8 ± 22.7* ( 13) |
| 1 ~ 42                | 190.9 ± 27.5 ( 13) | 179.2 ± 31.0 ( 13) | 175.0 ± 28.0 ( 13) | 160.3 ± 27.0 ( 13)  |

<sup>a)</sup> : vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)\* : significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)\*\* : significant difference from control,  $p < 0.01$  (by multiple comparisons)

Table 5

HBA: 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              | HBA                |                    |                    |                    |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                 | 200                | 1000               |
| Days of treatment     |                    |                    |                    |                    |
| 1 (Initial weight)    | 220.2 ± 7.5 ( 13)  | 219.6 ± 7.2 ( 13)  | 220.0 ± 7.9 ( 13)  | 220.3 ± 7.3 ( 13)  |
| 8                     | 235.0 ± 8.8 ( 13)  | 235.6 ± 8.8 ( 13)  | 239.5 ± 9.7 ( 13)  | 234.0 ± 12.7 ( 13) |
| 15                    | 248.7 ± 13.2 ( 13) | 249.8 ± 10.5 ( 13) | 253.3 ± 12.7 ( 13) | 246.8 ± 14.4 ( 13) |

<sup>a)</sup> : vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)



Table 6

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

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

| Compound              | HBA             |     |       |        |     |       |        |      |       |        |     |       |
|-----------------------|-----------------|-----|-------|--------|-----|-------|--------|------|-------|--------|-----|-------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup> |     |       | 40     |     |       | 200    |      |       | 1000   |     |       |
| Days of treatment     |                 |     |       |        |     |       |        |      |       |        |     |       |
| 1 ~ 8                 | 14.8 ±          | 5.1 | ( 13) | 16.0 ± | 4.8 | ( 13) | 19.5 ± | 7.9  | ( 13) | 13.6 ± | 8.2 | ( 13) |
| 8 ~15                 | 13.7 ±          | 5.8 | ( 13) | 14.3 ± | 3.3 | ( 13) | 13.8 ± | 5.2  | ( 13) | 12.8 ± | 6.7 | ( 13) |
| -----                 |                 |     |       |        |     |       |        |      |       |        |     |       |
| 1 ~15                 | 28.4 ±          | 8.5 | ( 13) | 30.2 ± | 4.8 | ( 13) | 33.3 ± | 11.9 | ( 13) | 26.5 ± | 8.8 | ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5% CMC Na (5 ml/kg)

Table 7

HBA: 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              | HBA                |                    |                   |                    |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                 | 200               | 1000               |
| Days of pregnancy     |                    |                    |                   |                    |
| 0                     | 257.7 ± 14.6 ( 13) | 256.6 ± 11.1 ( 12) | 254.4 ± 7.7 ( 9)  | 255.4 ± 17.0 ( 13) |
| 7                     | 293.4 ± 18.4 ( 13) | 291.2 ± 13.4 ( 12) | 290.9 ± 9.8 ( 9)  | 287.2 ± 17.7 ( 13) |
| 14                    | 326.4 ± 21.7 ( 13) | 325.7 ± 13.5 ( 12) | 327.8 ± 13.2 ( 9) | 320.7 ± 19.1 ( 13) |
| 20                    | 392.6 ± 38.3 ( 13) | 396.6 ± 29.1 ( 12) | 403.9 ± 22.2 ( 9) | 385.7 ± 35.8 ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)

Table 8

HDA: 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              | HBA                |                    |                   |                    |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                 | 200               | 1000               |
| Days of pregnancy     |                    |                    |                   |                    |
| 0 ~ 7                 | 35.8 ± 6.0 ( 13)   | 34.6 ± 6.2 ( 12)   | 36.5 ± 6.3 ( 9)   | 31.8 ± 7.5 ( 13)   |
| 7 ~ 14                | 33.0 ± 6.2 ( 13)   | 34.5 ± 4.2 ( 12)   | 36.9 ± 7.7 ( 9)   | 33.4 ± 6.9 ( 13)   |
| 14 ~ 20               | 66.2 ± 23.3 ( 13)  | 70.9 ± 22.9 ( 12)  | 76.2 ± 10.5 ( 9)  | 65.1 ± 24.9 ( 13)  |
| <hr/>                 |                    |                    |                   |                    |
| 0 ~ 14                | 68.8 ± 10.5 ( 13)  | 69.1 ± 7.0 ( 12)   | 73.4 ± 11.4 ( 9)  | 65.2 ± 12.4 ( 13)  |
| 0 ~ 20                | 135.0 ± 30.8 ( 13) | 140.0 ± 25.1 ( 12) | 149.5 ± 20.3 ( 9) | 130.3 ± 35.6 ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control : 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)

Table 9

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

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

| Compound          | HBA                    |                        |                       |                        |
|-------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                   | 0 <sup>a)</sup>        | 40                     | 200                   | 1000                   |
| Days of lactation |                        |                        |                       |                        |
| 0                 | 306.2 $\pm$ 22.3 ( 12) | 296.3 $\pm$ 16.0 ( 12) | 303.6 $\pm$ 22.7 ( 9) | 300.0 $\pm$ 23.4 ( 13) |
| 4                 | 322.8 $\pm$ 21.7 ( 12) | 312.9 $\pm$ 18.0 ( 12) | 317.2 $\pm$ 10.2 ( 9) | 317.6 $\pm$ 12.4 ( 12) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)

Table 10

HBA: 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              | HBA               |                   |                  |                   |
|-----------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>   | 40                | 200              | 1000              |
| Days of lactation     |                   |                   |                  |                   |
| 0 ~ 4                 | 16.6 ± 12.9 ( 12) | 16.5 ± 18.2 ( 12) | 13.6 ± 17.9 ( 9) | 15.7 ± 18.7 ( 12) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)

Table 11

HBA: 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           | HBA                    |                        |                        |                        |
|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                    | 0 <sup>a)</sup>        | 40                     | 200                    | 1000                   |
| Dose group (mg/kg) |                        |                        |                        |                        |
| Days of treatment  |                        |                        |                        |                        |
| 1 ~ 8              | 211.2 $\pm$ 18.3 ( 13) | 212.1 $\pm$ 15.5 ( 13) | 205.6 $\pm$ 18.0 ( 13) | 207.7 $\pm$ 19.6 ( 13) |
| 8 ~ 15             | 207.1 $\pm$ 21.2 ( 13) | 204.4 $\pm$ 19.5 ( 13) | 203.2 $\pm$ 15.4 ( 13) | 200.2 $\pm$ 18.2 ( 13) |
| 29 ~ 36            | 213.1 $\pm$ 20.9 ( 13) | 201.6 $\pm$ 20.3 ( 13) | 204.6 $\pm$ 20.1 ( 13) | 208.1 $\pm$ 18.6 ( 13) |
| 36 ~ 42            | 180.9 $\pm$ 18.2 ( 13) | 169.3 $\pm$ 18.4 ( 13) | 174.2 $\pm$ 17.8 ( 13) | 177.4 $\pm$ 14.3 ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)

Table 12

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

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

| Compound              | HBA                |                   |                    |                    |
|-----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                | 200                | 1000               |
| Days of treatment     |                    |                   |                    |                    |
| 1 ~ 8                 | 131.0 ± 10.0 ( 13) | 132.2 ± 6.9 ( 13) | 136.9 ± 13.2 ( 13) | 134.9 ± 14.7 ( 13) |
| 8 ~ 15                | 134.8 ± 12.5 ( 13) | 133.6 ± 9.8 ( 13) | 135.7 ± 12.3 ( 13) | 134.3 ± 13.1 ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)

Table 13

HBA: 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              | HBA                |                    |                   |                    |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                 | 200               | 1000               |
| Days of pregnancy     |                    |                    |                   |                    |
| 0 ~ 7                 | 170.6 ± 17.3 ( 13) | 162.8 ± 15.1 ( 12) | 161.7 ± 12.6 ( 9) | 159.5 ± 15.3 ( 13) |
| 7 ~ 14                | 180.9 ± 17.3 ( 13) | 178.6 ± 11.6 ( 12) | 186.0 ± 18.3 ( 9) | 178.0 ± 16.8 ( 13) |
| 14 ~ 20               | 140.4 ± 14.0 ( 13) | 142.2 ± 12.6 ( 12) | 142.4 ± 11.1 ( 9) | 133.2 ± 16.8 ( 13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)



Table 14

HBA: 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              | HBA                |                    |                   |                    |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Dose group<br>(mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>    | 40                 | 200               | 1000               |
| Days of lactation     |                    |                    |                   |                    |
| 0 ~ 4                 | 108.7 ± 22.3 ( 12) | 103.4 ± 34.3 ( 12) | 105.6 ± 16.7 ( 9) | 111.8 ± 24.9 ( 12) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)

Table 15

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

Hematological findings of Po males after oral administration for 42 days

| Group      | R B C<br>( $\times 10^4/\text{mm}^3$ ) | Hemoglobin<br>(g/dl)      | Hematocrit<br>(%)         | M C V<br>( $\mu\text{m}^3$ ) | M C H<br>(pg)             | M C H C<br>(%)            | Platelet<br>( $\times 10^4/\text{mm}^3$ ) |
|------------|----------------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|
| 0 a)       | (13)<br>829<br>$\pm 35$                | (13)<br>15.6<br>$\pm 0.6$ | (13)<br>44.5<br>$\pm 1.6$ | (13)<br>53.7<br>$\pm 1.7$    | (13)<br>18.9<br>$\pm 0.7$ | (13)<br>35.2<br>$\pm 0.6$ | (13)<br>115.2<br>$\pm 9.4$                |
| 40 mg/kg   | (13)<br>815<br>$\pm 23$                | (13)<br>15.6<br>$\pm 0.4$ | (13)<br>44.4<br>$\pm 1.1$ | (13)<br>54.5<br>$\pm 1.0$    | (13)<br>19.2<br>$\pm 0.4$ | (13)<br>35.2<br>$\pm 0.4$ | (13)<br>108.4<br>$\pm 6.5$                |
| 200 mg/kg  | (13)<br>810<br>$\pm 33$                | (13)<br>15.4<br>$\pm 0.5$ | (13)<br>44.3<br>$\pm 1.4$ | (13)<br>54.7<br>$\pm 1.2$    | (13)<br>19.0<br>$\pm 0.5$ | (13)<br>34.8<br>$\pm 0.2$ | (13)<br>104.6**<br>$\pm 5.8$              |
| 1000 mg/kg | (13)<br>809<br>$\pm 25$                | (13)<br>15.3<br>$\pm 0.4$ | (13)<br>44.0<br>$\pm 1.3$ | (13)<br>54.4<br>$\pm 1.1$    | (13)<br>18.9<br>$\pm 0.4$ | (13)<br>34.7<br>$\pm 0.3$ | (13)<br>99.1**<br>$\pm 6.1$               |

| Group      | W B C<br>( $\times 100/\text{mm}^3$ ) | Band<br>neutrophil<br>(%) | Segmented<br>neutrophil<br>(%) | Eosinophil<br>(%)      | Basophil<br>(%)      | Monocyte<br>(%)      | Lymphocyte<br>(%)       |
|------------|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| 0 a)       | (13)<br>82<br>$\pm 8$                 | (13)<br>0<br>$\pm 0$      | (13)<br>20<br>$\pm 5$          | (13)<br>0<br>$\pm 1$   | (13)<br>0<br>$\pm 0$ | (13)<br>3<br>$\pm 2$ | (13)<br>77<br>$\pm 6$   |
| 40 mg/kg   | (13)<br>64**<br>$\pm 16$              | (13)<br>0<br>$\pm 0$      | (13)<br>23<br>$\pm 8$          | (13)<br>2**<br>$\pm 2$ | (13)<br>0<br>$\pm 0$ | (13)<br>3<br>$\pm 2$ | (13)<br>72<br>$\pm 9$   |
| 200 mg/kg  | (13)<br>71<br>$\pm 13$                | (13)<br>0<br>$\pm 0$      | (13)<br>29<br>$\pm 12$         | (13)<br>2<br>$\pm 1$   | (13)<br>0<br>$\pm 0$ | (13)<br>4<br>$\pm 2$ | (13)<br>65*<br>$\pm 12$ |
| 1000 mg/kg | (13)<br>68*<br>$\pm 16$               | (13)<br>0<br>$\pm 0$      | (13)<br>31*<br>$\pm 14$        | (13)<br>1<br>$\pm 2$   | (13)<br>0<br>$\pm 0$ | (13)<br>3<br>$\pm 2$ | (13)<br>65*<br>$\pm 14$ |

a): vehicle control: 0.5% CMC Na  
 Parameter: mean S.D.  
 ( ): number of animals

\*: significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)  
 \*\*: significant difference from control,  $p < 0.01$  (by multiple comparisons)

Table 16

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

Biochemical findings of Fo males after oral administration for 42 days

| Group      | Total protein<br>(g/dl) | Albumin<br>(g/dl)   | A/G                    | BUN<br>(mg/dl)   | Creatinine<br>(mg/dl) | Glucose<br>(mg/dl)   | Total cholesterol<br>(mg/dl) | Total bilirubin<br>(mg/dl) |
|------------|-------------------------|---------------------|------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------------|
| 0 a)       | (13)<br>5.8<br>±0.3     | (13)<br>3.1<br>±0.2 | (13)<br>1.14<br>±0.13  | (13)<br>17<br>±2 | (13)<br>0.7<br>±0.0   | (13)<br>132<br>±13   | (13)<br>55<br>±9             | (13)<br>0.09<br>±0.01      |
| 40 mg/kg   | (13)<br>5.9<br>±0.2     | (13)<br>3.1<br>±0.2 | (13)<br>1.08<br>±0.13  | (13)<br>18<br>±4 | (13)<br>0.7<br>±0.1   | (13)<br>121*<br>±9   | (13)<br>54<br>±13            | (13)<br>0.08<br>±0.01      |
| 200 mg/kg  | (13)<br>5.8<br>±0.3     | (13)<br>3.0<br>±0.1 | (13)<br>1.08<br>±0.10  | (13)<br>17<br>±2 | (13)<br>0.7<br>±0.1   | (13)<br>116**<br>±7  | (13)<br>58<br>±17            | (13)<br>0.08<br>±0.02      |
| 1000 mg/kg | (13)<br>5.3**<br>±0.3   | (13)<br>2.9<br>±0.2 | (13)<br>1.29*<br>±0.20 | (13)<br>19<br>±4 | (13)<br>0.7<br>±0.1   | (13)<br>118**<br>±14 | (13)<br>45<br>±8             | (13)<br>0.09<br>±0.03      |

| Group      | Na<br>(mEq/l)         | K<br>(mEq/l)          | Cl<br>(mEq/l)         | Ca<br>(mg/dl)         | Inorg. phos.<br>(mg/dl) | ALP<br>(U/l)       | GPT<br>(U/l)       | GOT<br>(U/l)        | γ-GTP<br>(U/l)  |
|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------|
| 0 a)       | (13)<br>145.0<br>±0.5 | (13)<br>3.88<br>±0.23 | (13)<br>107.9<br>±1.3 | (13)<br>8.5<br>±0.3   | (13)<br>4.7<br>±0.6     | (13)<br>198<br>±41 | (13)<br>26<br>±4   | (13)<br>63<br>±7    | (13)<br>0<br>±0 |
| 40 mg/kg   | (13)<br>145.2<br>±1.1 | (13)<br>3.77<br>±0.18 | (13)<br>108.1<br>±1.4 | (13)<br>8.6<br>±0.2   | (13)<br>5.2<br>±0.4     | (13)<br>227<br>±52 | (13)<br>28<br>±4   | (13)<br>68<br>±6    | (13)<br>0<br>±0 |
| 200 mg/kg  | (13)<br>145.5<br>±0.7 | (13)<br>3.75<br>±0.17 | (13)<br>108.3<br>±0.9 | (13)<br>8.8**<br>±0.3 | (13)<br>5.6**<br>±0.6   | (13)<br>208<br>±37 | (13)<br>27<br>±4   | (13)<br>71<br>±13   | (13)<br>0<br>±1 |
| 1000 mg/kg | (13)<br>145.1<br>±1.3 | (13)<br>3.75<br>±0.11 | (13)<br>108.9<br>±1.3 | (13)<br>8.5<br>±0.2   | (13)<br>5.6**<br>±0.4   | (13)<br>220<br>±44 | (13)<br>32**<br>±6 | (13)<br>81**<br>±15 | (13)<br>0<br>±0 |

a): vehicle control: 0.5% CMC Na  
 Parameter: mean S.D.  
 ( ): number of animals

\*: significant difference from control,  $p < 0.05$  (by multiple comparisons)  
 \*\*: significant difference from control,  $p < 0.01$  (by multiple comparisons)

Table 17

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

## Summary of macroscopic findings in Fo males

| Group<br>Grade              | Control |   | 40 mg/kg |   | 200 mg/kg |   | 1000 mg/kg |   |
|-----------------------------|---------|---|----------|---|-----------|---|------------|---|
|                             | -       | + | -        | + | -         | + | -          | + |
| (Thymus)                    | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Small                       | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| Dark colored spot/area      | 13      | 0 | 11       | 2 | 12        | 1 | 13         | 0 |
| (Lung)                      | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Dark colored spot           | 12      | 1 | 13       | 0 | 11        | 2 | 10         | 3 |
| (Spleen)                    | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Cyst                        | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Adrenal gland)             | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Small                       | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| Not detected, right         | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| Enlargement, left           | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| (Kidney)                    | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Pale colored cortex         | 13      | 0 | 11       | 2 | 12        | 1 | 13         | 0 |
| Recessed area               | 13      | 0 | 13       | 0 | 12        | 1 | 13         | 0 |
| Dilatation of pelvis        | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Prostate)                  | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Enlargement                 | 13      | 0 | 12       | 1 | 11        | 2 | 13         | 0 |
| (Seminal vesicle)           | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Enlargement                 | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Testis)                    | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Small                       | 11      | 2 | 13       | 0 | 12        | 1 | 13         | 0 |
| (Epididymis)                | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Small                       | 11      | 2 | 13       | 0 | 12        | 1 | 13         | 0 |
| Yellowish white nodule      | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| (Liver)                     | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Accentuated lobular pattern | 11      | 2 | 9        | 4 | 9         | 4 | 10         | 3 |
| Yellowish                   | 12      | 1 | 12       | 1 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| Pale colored spot           | 12      | 1 | 11       | 2 | 11        | 2 | 12         | 1 |
| Dark colored area           | 12      | 1 | 13       | 0 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Stomach)                   | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Hematin                     | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| Thickened mucosa            |         |   |          |   |           |   |            |   |
| of glandular stomach        | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| Projection                  | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 12         | 1 |

-, Negative; +, Positive

[ ], Number of animals examined

Table 18

HBA: 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) | HBA                                                                   |                                            |                                           |                                           |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                          |                       | 0 <sup>a)</sup>                                                       | 40                                         | 200                                       | 1000                                      |
| Terminal body weight (g) |                       | 489.5 $\pm$ 31.6 ( 13)                                                | 478.1 $\pm$ 32.1 ( 13)                     | 473.6 $\pm$ 34.3 ( 13)                    | 458.1 $\pm$ 31.8 ( 13)                    |
| Liver (g)                |                       | 13.52 $\pm$ 1.60 <sup>b)</sup> ( 13)<br>2.76 $\pm$ 0.22 <sup>c)</sup> | 12.21 $\pm$ 1.59 ( 13)<br>2.55 $\pm$ 0.20  | 12.63 $\pm$ 1.07 ( 13)<br>2.67 $\pm$ 0.13 | 12.24 $\pm$ 1.67 ( 13)<br>2.66 $\pm$ 0.20 |
| Kidneys (g)              |                       | 3.02 $\pm$ 0.23 ( 13)<br>0.62 $\pm$ 0.04                              | 2.83 $\pm$ 0.22 ( 13)<br>0.59 $\pm$ 0.04   | 2.97 $\pm$ 0.26 ( 13)<br>0.63 $\pm$ 0.05  | 2.98 $\pm$ 0.24 ( 13)<br>0.65 $\pm$ 0.04  |
| Lung (g)                 |                       | 1.31 $\pm$ 0.08 ( 13)<br>0.27 $\pm$ 0.02                              | 1.27 $\pm$ 0.09 ( 13)<br>0.27 $\pm$ 0.02   | 1.30 $\pm$ 0.10 ( 13)<br>0.28 $\pm$ 0.02  | 1.27 $\pm$ 0.10 ( 13)<br>0.28 $\pm$ 0.02  |
| Thymus (mg)              |                       | 406.5 $\pm$ 69.5 ( 13)<br>83.1 $\pm$ 14.1                             | 364.9 $\pm$ 106.8 ( 13)<br>76.2 $\pm$ 21.6 | 379.3 $\pm$ 44.9 ( 13)<br>80.1 $\pm$ 8.4  | 357.1 $\pm$ 72.8 ( 13)<br>78.1 $\pm$ 15.9 |
| Testes (g)               |                       | 2.92 $\pm$ 0.64 ( 13)<br>0.60 $\pm$ 0.13                              | 3.17 $\pm$ 0.18 ( 13)<br>0.67 $\pm$ 0.07   | 2.93 $\pm$ 0.60 ( 13)<br>0.62 $\pm$ 0.14  | 3.13 $\pm$ 0.21 ( 13)<br>0.69 $\pm$ 0.07  |
| Epididymides (g)         |                       | 1.13 $\pm$ 0.21 ( 13)<br>0.23 $\pm$ 0.04                              | 1.16 $\pm$ 0.07 ( 13)<br>0.24 $\pm$ 0.03   | 1.15 $\pm$ 0.16 ( 13)<br>0.24 $\pm$ 0.04  | 1.17 $\pm$ 0.09 ( 13)<br>0.26 $\pm$ 0.03  |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)<sup>b)</sup>: absolute weight<sup>c)</sup>: relative weight (g or mg per 100g body weight)

Table 19-1

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

## Summary of histopathological findings in Fo males

| Group<br>Grade                     | Control |   |    |    |     |      | 1000 mg/kg |   |    |    |     |      |
|------------------------------------|---------|---|----|----|-----|------|------------|---|----|----|-----|------|
|                                    | -       | ± | +  | ++ | +++ | Pos. | -          | ± | +  | ++ | +++ | Pos. |
| (Liver)                            | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Fatty change, periportal           | 0       | 0 | 10 | 3  | 0   | 13   | 0          | 0 | 12 | 1  | 0   | 13   |
| Microgranuloma                     | 0       | 2 | 11 | 0  | 0   | 13   | 0          | 3 | 10 | 0  | 0   | 13   |
| (Heart)                            | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Myocardial degeneration / fibrosis | 10      | 3 | 0  | 0  | 0   | 3    | 10         | 3 | 0  | 0  | 0   | 3    |
| (Thymus)                           | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| No remarkable change               |         |   |    |    |     |      |            |   |    |    |     |      |
| (Kidney)                           | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Basophilic tubule, cortex          | 7       | 6 | 0  | 0  | 0   | 6    | 5          | 8 | 0  | 0  | 0   | 8    |
| Eosinophilic body                  | 7       | 3 | 2  | 1  | 0   | 6    | 12         | 0 | 0  | 1  | 0   | 1#   |
| Cast, hyaline                      | 12      | 0 | 1  | 0  | 0   | 1    | 13         | 0 | 0  | 0  | 0   | 0    |
| Cellular infiltration, lymphocyte  | 12      | 1 | 0  | 0  | 0   | 1    | 13         | 0 | 0  | 0  | 0   | 0    |
| (Adrenal)                          | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| No remarkable change               |         |   |    |    |     |      |            |   |    |    |     |      |
| (Urinary bladder)                  | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Cellular infiltration, lymphocyte  | 12      | 1 | 0  | 0  | 0   | 1    | 12         | 1 | 0  | 0  | 0   | 1    |
| (Lung)                             | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Metaplasia, osseous                | 13      | 0 | 0  | 0  | 0   | 0    | 12         | 0 | 1  | 0  | 0   | 1    |
| (Spleen)                           | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Deposit, pigment, brown            | 0       | 0 | 13 | 0  | 0   | 13   | 0          | 1 | 12 | 0  | 0   | 13   |
| Extramedullary hematopoiesis       | 1       | 2 | 10 | 0  | 0   | 12   | 0          | 6 | 7  | 0  | 0   | 13   |
| (Brain)                            | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| No remarkable change               |         |   |    |    |     |      |            |   |    |    |     |      |
| (Testis)                           | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Spermatogenesis, decreased, focal  | 6       | 3 | 2  | 2  | 0   | 7    | 10         | 2 | 1  | 0  | 0   | 3    |
| Multinucleated giant cell          | 9       | 3 | 1  | 0  | 0   | 4    | 13         | 0 | 0  | 0  | 0   | 0#   |
| (Epididymis)                       | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Spermatic granuloma                | 12      | 0 | 1  | 0  | 0   | 1    | 12         | 0 | 1  | 0  | 0   | 1    |

-, 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 19-2

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

Mann-Whitney U test of histopathological findings in Fo males

| Group<br>Grade                        | Control |   |    |    |     | 1000 mg/kg |   |    |    |            |
|---------------------------------------|---------|---|----|----|-----|------------|---|----|----|------------|
|                                       | -       | ± | +  | ++ | +++ | -          | ± | +  | ++ | +++        |
| (Liver)                               | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| Fatty change, periportal              | 0       | 0 | 10 | 3  | 0   | 0          | 0 | 12 | 1  | 0 U = 71.5 |
| Microgranuloma                        | 0       | 2 | 11 | 0  | 0   | 0          | 3 | 10 | 0  | 0 U = 78.0 |
| (Heart)                               | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| Myocardial<br>degeneration / fibrosis | 10      | 3 | 0  | 0  | 0   | 10         | 3 | 0  | 0  | 0 U = 84.5 |
| (Thymus)                              | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| No remarkable change                  |         |   |    |    |     |            |   |    |    |            |
| (Kidney)                              | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| Basophilic tubule, cortex             | 7       | 6 | 0  | 0  | 0   | 5          | 8 | 0  | 0  | 0 U = 71.5 |
| Eosinophilic body                     | 7       | 3 | 2  | 1  | 0   | 12         | 0 | 0  | 1  | 0 U = 54.5 |
| Cast, hyaline                         | 12      | 0 | 1  | 0  | 0   | 13         | 0 | 0  | 0  | 0 U = 78.0 |
| Cellular infiltration,<br>lymphocyte  | 12      | 1 | 0  | 0  | 0   | 13         | 0 | 0  | 0  | 0 U = 78.0 |
| (Adrenal)                             | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| No remarkable change                  |         |   |    |    |     |            |   |    |    |            |
| (Urinary bladder)                     | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| Cellular infiltration,<br>lymphocyte  | 12      | 1 | 0  | 0  | 0   | 12         | 1 | 0  | 0  | 0 U = 84.5 |
| (Lung)                                | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| Metaplasia, osseous                   | 13      | 0 | 0  | 0  | 0   | 12         | 0 | 1  | 0  | 0 U = 78.0 |
| (Spleen)                              | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| Deposit, pigment, brown               | 0       | 0 | 13 | 0  | 0   | 0          | 1 | 12 | 0  | 0 U = 78.0 |
| Extramedullary hematopoiesis          | 1       | 2 | 10 | 0  | 0   | 0          | 6 | 7  | 0  | 0 U = 68.0 |
| (Brain)                               | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| No remarkable change                  |         |   |    |    |     |            |   |    |    |            |
| (Testis)                              | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| Spermatogenesis,<br>decreased, focal  | 6       | 3 | 2  | 2  | 0   | 10         | 2 | 1  | 0  | 0 U = 55.0 |
| Multinucleated giant cell             | 9       | 3 | 1  | 0  | 0   | 13         | 0 | 0  | 0  | 0 U = 58.5 |
| (Epididymis)                          | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |            |
| Spermatic granuloma                   | 12      | 0 | 1  | 0  | 0   | 12         | 0 | 1  | 0  | 0 U = 84.5 |

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

[ ], Number of animals examined

Table 19-3

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

Fisher exact test of histopathological findings in Fo males

| Group<br>Grade                        | Control  |          | 1000 mg/kg |          |    |         |
|---------------------------------------|----------|----------|------------|----------|----|---------|
|                                       | Negative | Positive | Negative   | Positive |    |         |
| (Liver)                               | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Fatty change, periportal              | 0        | 13       | 0          | 13       | P= | 1.00000 |
| Microgranuloma                        | 0        | 13       | 0          | 13       | P= | 1.00000 |
| (Heart)                               | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Myocardial<br>degeneration / fibrosis | 10       | 3        | 10         | 3        | P= | 0.67764 |
| (Thymus)                              | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Abnormality                           | 13       | 0        | 13         | 0        |    |         |
| (Kidney)                              | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Basophilic tubule, cortex             | 7        | 6        | 5          | 8        | P= | 0.34755 |
| Eosinophilic body                     | 7        | 6        | 12         | 1*       | P= | 0.03652 |
| Cast, hyaline                         | 12       | 1        | 13         | 0        | P= | 0.50000 |
| Cellular infiltration,<br>lymphocyte  | 12       | 1        | 13         | 0        | P= | 0.50000 |
| (Adrenal)                             | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Abnormality                           | 13       | 0        | 13         | 0        |    |         |
| (Urinary bladder)                     | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Cellular infiltration,<br>lymphocyte  | 12       | 1        | 12         | 1        | P= | 0.76000 |
| (Lung)                                | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Metaplasia, osseous                   | 13       | 0        | 12         | 1        | P= | 0.50000 |
| (Spleen)                              | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Deposit, pigment, brown               | 0        | 13       | 0          | 13       | P= | 1.00000 |
| Extramedullary hematopoiesis          | 1        | 12       | 0          | 13       | P= | 0.50000 |
| (Brain)                               | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Abnormality                           | 13       | 0        | 13         | 0        |    |         |
| (Testis)                              | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Spermatogenesis,<br>decreased, focal  | 6        | 7        | 10         | 3        | P= | 0.11310 |
| Multinucleated giant cell             | 9        | 4        | 13         | 0*       | P= | 0.04783 |
| (Epididymis)                          | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Spermatic granuloma                   | 12       | 1        | 12         | 1        | P= | 0.76000 |

[ ], Number of animals examined

\*, Significantly different from control  $p < 0.05$  (Fisher exact test)



Table 20

HBA: 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 |   |
|-------------------------------|---------|---|----------|---|-----------|---|------------|---|
|                               | -       | + | -        | + | -         | + | -          | + |
| (Thymus)                      | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Small                         | 11      | 2 | 8        | 5 | 11        | 2 | 10         | 3 |
| Dark color/ dark colored area | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| (Lung)                        | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Dark colored area             | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Spleen)                      | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Small                         | 12      | 1 | 13       | 0 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Adrenal gland)               | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Dark color                    | 12      | 1 | 13       | 0 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Kidney)                      | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Pale colored cortex           | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| Dilatation of pelvis          | 13      | 0 | 13       | 0 | 12        | 1 | 12         | 1 |
| (Pituitary gland)             | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Enlargement                   | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| Translucent                   | 13      | 0 | 12       | 1 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| (Liver)                       | [13]    |   | [13]     |   | [13]      |   | [13]       |   |
| Nodule                        | 12      | 1 | 13       | 0 | 13        | 0 | 13         | 0 |
| Accentuated lobular pattern   | 13      | 0 | 13       | 0 | 11        | 2 | 12         | 1 |
| Yellowish                     | 13      | 0 | 13       | 0 | 12        | 1 | 13         | 0 |
| Pale color                    | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 12         | 1 |
| Dark color                    | 13      | 0 | 13       | 0 | 13        | 0 | 10         | 3 |

-, Negative; +, Positive

[ ], Number of animals examined

Table 21

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

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

| Compound                 | Dose group<br>(mg/kg) | HBA                                  |                         |                       |                        |
|--------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
|                          |                       | 0 <sup>a)</sup>                      | 40                      | 200                   | 1000                   |
| Terminal body weight (g) |                       | 322.8 $\pm$ 21.7 ( 12)               | 312.9 $\pm$ 18.0 ( 12)  | 317.2 $\pm$ 10.2 ( 9) | 317.6 $\pm$ 12.4 ( 12) |
| Liver (g)                |                       | 13.28 $\pm$ 1.42 <sup>b)</sup> ( 12) | 12.96 $\pm$ 1.41 ( 12)  | 12.41 $\pm$ 1.20 ( 9) | 13.87 $\pm$ 1.67 ( 12) |
|                          |                       | 4.12 $\pm$ 0.38 <sup>c)</sup>        | 4.15 $\pm$ 0.41         | 3.92 $\pm$ 0.42       | 4.36 $\pm$ 0.45        |
| Kidneys (g)              |                       | 1.92 $\pm$ 0.14 ( 12)                | 1.90 $\pm$ 0.11 ( 12)   | 1.80 $\pm$ 0.15 ( 9)  | 2.01 $\pm$ 0.20 ( 12)  |
|                          |                       | 0.60 $\pm$ 0.05                      | 0.61 $\pm$ 0.04         | 0.57 $\pm$ 0.05       | 0.63 $\pm$ 0.06        |
| Lung (g)                 |                       | 1.05 $\pm$ 0.09 ( 12)                | 1.05 $\pm$ 0.07 ( 12)   | 1.02 $\pm$ 0.09 ( 9)  | 1.08 $\pm$ 0.06 ( 12)  |
|                          |                       | 0.32 $\pm$ 0.02                      | 0.34 $\pm$ 0.02         | 0.32 $\pm$ 0.03       | 0.34 $\pm$ 0.01        |
| Thymus (mg)              |                       | 198.1 $\pm$ 76.1 ( 12)               | 197.0 $\pm$ 102.8 ( 12) | 198.3 $\pm$ 49.0 ( 9) | 216.2 $\pm$ 60.6 ( 12) |
|                          |                       | 61.1 $\pm$ 22.9                      | 62.3 $\pm$ 31.1         | 62.5 $\pm$ 15.3       | 68.0 $\pm$ 18.5        |

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

b): absolute weight

c): relative weight (g or mg per 100g body weight)

Table 22-1

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

## Summary of histopathological findings in Fo females

| Group<br>Grade               | Control |   |    |    |     |      | 1000 mg/kg |   |    |    |     |      |
|------------------------------|---------|---|----|----|-----|------|------------|---|----|----|-----|------|
|                              | -       | ± | +  | ++ | +++ | Pos. | -          | ± | +  | ++ | +++ | Pos. |
| (Liver)                      | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Fatty change, periportal     | 12      | 1 | 0  | 0  | 0   | 1    | 12         | 1 | 0  | 0  | 0   | 1    |
| Microgranuloma               | 9       | 4 | 0  | 0  | 0   | 4    | 12         | 1 | 0  | 0  | 0   | 1    |
| Necrosis, focal              | 11      | 2 | 0  | 0  | 0   | 2    | 13         | 0 | 0  | 0  | 0   | 0    |
| Granuloma                    | 12      | 0 | 1  | 0  | 0   | 1    | 13         | 0 | 0  | 0  | 0   | 0    |
| (Heart)                      | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| No remarkable change         |         |   |    |    |     |      |            |   |    |    |     |      |
| (Thymus)                     | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Atrophy                      | 7       | 2 | 4  | 0  | 0   | 6    | 6          | 7 | 0  | 0  | 0   | 7    |
| (Kidney)                     | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Basophilic tubule, cortex    | 9       | 4 | 0  | 0  | 0   | 4    | 7          | 6 | 0  | 0  | 0   | 6    |
| Dilatation, renal pelvis     | 13      | 0 | 0  | 0  | 0   | 0    | 12         | 0 | 1  | 0  | 0   | 1    |
| (Adrenal)                    | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| No remarkable change         |         |   |    |    |     |      |            |   |    |    |     |      |
| (Urinary bladder)            | [12]    |   |    |    |     |      | [12]       |   |    |    |     |      |
| No remarkable change         |         |   |    |    |     |      |            |   |    |    |     |      |
| (Lung)                       | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Inflammation, focal          | 12      | 1 | 0  | 0  | 0   | 1    | 9          | 2 | 2  | 0  | 0   | 4    |
| (Spleen)                     | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| Deposit, pigment, brown      | 0       | 0 | 13 | 0  | 0   | 13   | 0          | 0 | 13 | 0  | 0   | 13   |
| Extramedullary hematopoiesis | 0       | 1 | 6  | 6  | 0   | 13   | 1          | 0 | 9  | 3  | 0   | 12   |
| (Brain)                      | [13]    |   |    |    |     |      | [13]       |   |    |    |     |      |
| No remarkable change         |         |   |    |    |     |      |            |   |    |    |     |      |

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade  
[ ], Number of animals examined

Table 22-2

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

Mann-Whitney U test of histopathological findings in Fo females

| Group<br>Grade               | Control |   |    |    |     | 1000 mg/kg |   |    |    |          |
|------------------------------|---------|---|----|----|-----|------------|---|----|----|----------|
|                              | -       | ± | +  | ++ | +++ | -          | ± | +  | ++ | +++      |
| (Liver)                      | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |          |
| Fatty change, periportal     | 12      | 1 | 0  | 0  | 0   | 12         | 1 | 0  | 0  | U = 84.5 |
| Microgranuloma               | 9       | 4 | 0  | 0  | 0   | 12         | 1 | 0  | 0  | U = 65.0 |
| Necrosis, focal              | 11      | 2 | 0  | 0  | 0   | 13         | 0 | 0  | 0  | U = 71.5 |
| Granuloma                    | 12      | 0 | 1  | 0  | 0   | 13         | 0 | 0  | 0  | U = 78.0 |
| (Heart)                      | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |          |
| No remarkable change         |         |   |    |    |     |            |   |    |    |          |
| (Thymus)                     | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |          |
| Atrophy                      | 7       | 2 | 4  | 0  | 0   | 6          | 7 | 0  | 0  | U = 77.0 |
| (Kidney)                     | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |          |
| Basophilic tubule, cortex    | 9       | 4 | 0  | 0  | 0   | 7          | 6 | 0  | 0  | U = 71.5 |
| Dilatation, renal pelvis     | 13      | 0 | 0  | 0  | 0   | 12         | 0 | 1  | 0  | U = 78.0 |
| (Adrenal)                    | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |          |
| No remarkable change         |         |   |    |    |     |            |   |    |    |          |
| (Urinary bladder)            | [12]    |   |    |    |     | [12]       |   |    |    |          |
| No remarkable change         |         |   |    |    |     |            |   |    |    |          |
| (Lung)                       | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |          |
| Inflammation, focal          | 12      | 1 | 0  | 0  | 0   | 9          | 2 | 2  | 0  | U = 64.0 |
| (Spleen)                     | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |          |
| Deposit, pigment, brown      | 0       | 0 | 13 | 0  | 0   | 0          | 0 | 13 | 0  | U = 84.5 |
| Extramedullary hematopoiesis | 0       | 1 | 6  | 6  | 0   | 1          | 0 | 9  | 3  | U = 66.0 |
| (Brain)                      | [13]    |   |    |    |     | [13]       |   |    |    |          |
| No remarkable change         |         |   |    |    |     |            |   |    |    |          |

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

[ ], Number of animals examined

Table 22-3

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

Fisher exact test of histopathological findings in Fo females

| Group<br>Grade               | Control  |          | 1000 mg/kg |          |    |         |
|------------------------------|----------|----------|------------|----------|----|---------|
|                              | Negative | Positive | Negative   | Positive |    |         |
| (Liver)                      | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Fatty change, periportal     | 12       | 1        | 12         | 1        | P= | 0.76000 |
| Microgranuloma               | 9        | 4        | 12         | 1        | P= | 0.16087 |
| Necrosis, focal              | 11       | 2        | 13         | 0        | P= | 0.24000 |
| Granuloma                    | 12       | 1        | 13         | 0        | P= | 0.50000 |
| (Heart)                      | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Abnormality                  | 13       | 0        | 13         | 0        |    |         |
| (Thymus)                     | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Atrophy                      | 7        | 6        | 6          | 7        | P= | 0.50000 |
| (Kidney)                     | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Basophilic tubule, cortex    | 9        | 4        | 7          | 6        | P= | 0.34408 |
| Dilatation, renal pelvis     | 13       | 0        | 12         | 1        | P= | 0.50000 |
| (Adrenal)                    | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Abnormality                  | 13       | 0        | 13         | 0        |    |         |
| (Urinary bladder)            | [12]     |          | [12]       |          |    |         |
| Abnormality                  | 12       | 0        | 12         | 0        |    |         |
| (Lung)                       | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Inflammation, focal          | 12       | 1        | 9          | 4        | P= | 0.16087 |
| (Spleen)                     | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Deposit, pigment, brown      | 0        | 13       | 0          | 13       | P= | 1.00000 |
| Extramedullary hematopoiesis | 0        | 13       | 1          | 12       | P= | 0.50000 |
| (Brain)                      | [13]     |          | [13]       |          |    |         |
| Abnormality                  | 13       | 0        | 13         | 0        |    |         |

[ ], Number of animals examined

Table 23

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

Reproductive performance of animals

| Compound                                             | HBA               |                   |                   |                   |
|------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                      | 0 <sup>a)</sup>   | 40                | 200               | 1000              |
| Dose group<br>(mg/kg)                                |                   |                   |                   |                   |
| Number of mated pairs                                | 13                | 13                | 13                | 13                |
| Number of copulated pairs                            | 13                | 13                | 12                | 13                |
| Copulation index A)                                  | 100.0             | 100.0             | 92.3              | 100.0             |
| Number of pregnant animals                           | 13                | 12                | 9                 | 13                |
| Fertility index B)                                   | 100.0             | 92.3              | 75.0              | 100.0             |
| Pairing days until copulation<br>Mean $\pm$ S.D. (N) | 2.8 $\pm$ 1.1(13) | 2.3 $\pm$ 0.8(13) | 2.6 $\pm$ 1.9(12) | 2.7 $\pm$ 0.9(13) |
| Frequency of vaginal estrus<br>Mean $\pm$ S.D. (N)   | 1.0 $\pm$ 0.0(13) | 1.0 $\pm$ 0.0(13) | 1.1 $\pm$ 0.3(12) | 1.0 $\pm$ 0.0(13) |

<sup>a)</sup>: vehicle control: 0.5 % CMC Na (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

HBA: 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)         | HBA                    |                        |                       |                        |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                                           | 0 a)                   | 40                     | 200                   | 1000                   |
| Number of pregnant females                | 13                     | 12                     | 9                     | 13                     |
| Number of pregnant females with live pups | 12                     | 12                     | 9                     | 13                     |
| Gestation index A)                        | 92.3                   | 100.0                  | 100.0                 | 100.0                  |
| Gestation length (days)                   | 22.3 $\pm$ 0.5 ( 12 )  | 22.6 $\pm$ 0.7 ( 12 )  | 22.0 $\pm$ 0.5 ( 9 )  | 22.3 $\pm$ 0.5 ( 13 )  |
| Number of corpora lutea                   | 17.8 $\pm$ 3.7 ( 13 )  | 18.3 $\pm$ 2.8 ( 12 )  | 17.1 $\pm$ 1.5 ( 9 )  | 16.7 $\pm$ 4.4 ( 13 )  |
| Number of implantation sites              | 13.4 $\pm$ 5.9 ( 13 )  | 14.2 $\pm$ 5.2 ( 12 )  | 16.2 $\pm$ 1.8 ( 9 )  | 13.6 $\pm$ 5.3 ( 13 )  |
| Implantation index B)                     | 71.6 $\pm$ 28.9 ( 13 ) | 76.1 $\pm$ 26.9 ( 12 ) | 94.8 $\pm$ 6.1 ( 9 )  | 78.7 $\pm$ 21.3 ( 13 ) |
| Day 0 of lactation                        |                        |                        |                       |                        |
| Number of pups born                       | 12.6 $\pm$ 5.8 ( 13 )  | 12.8 $\pm$ 5.3 ( 12 )  | 15.0 $\pm$ 2.0 ( 9 )  | 12.4 $\pm$ 5.4 ( 13 )  |
| Delivery index C)                         | 87.8 $\pm$ 26.8 ( 13 ) | 85.2 $\pm$ 18.3 ( 12 ) | 92.5 $\pm$ 8.0 ( 9 )  | 85.9 $\pm$ 18.6 ( 13 ) |
| Number of live pups                       | 12.5 $\pm$ 5.8 ( 13 )  | 12.8 $\pm$ 5.3 ( 12 )  | 15.0 $\pm$ 2.0 ( 9 )  | 12.2 $\pm$ 5.2 ( 13 )  |
| Birth index D)                            | 87.4 $\pm$ 26.7 ( 13 ) | 85.2 $\pm$ 18.3 ( 12 ) | 92.5 $\pm$ 8.0 ( 9 )  | 84.6 $\pm$ 18.1 ( 13 ) |
| Live birth index E)                       | 99.5 $\pm$ 1.8 ( 12 )  | 100.0 $\pm$ 0.0 ( 12 ) | 100.0 $\pm$ 0.0 ( 9 ) | 98.7 $\pm$ 4.6 ( 13 )  |
| Sex ratio F)                              | 47.6 $\pm$ 16.9 ( 12 ) | 38.6 $\pm$ 21.1 ( 12 ) | 54.9 $\pm$ 14.9 ( 9 ) | 47.8 $\pm$ 25.0 ( 13 ) |
| Day 4 of lactation                        |                        |                        |                       |                        |
| Number of live pups                       | 12.4 $\pm$ 5.7 ( 13 )  | 12.6 $\pm$ 5.2 ( 12 )  | 15.0 $\pm$ 2.0 ( 9 )  | 12.1 $\pm$ 5.4 ( 13 )  |
| Viability index G)                        | 98.9 $\pm$ 2.7 ( 12 )  | 99.0 $\pm$ 2.4 ( 12 )  | 100.0 $\pm$ 0.0 ( 9 ) | 92.3 $\pm$ 27.7 ( 13 ) |
| Sex ratio H)                              | 47.9 $\pm$ 16.5 ( 12 ) | 38.0 $\pm$ 20.9 ( 12 ) | 54.9 $\pm$ 14.9 ( 9 ) | 43.4 $\pm$ 20.3 ( 12 ) |

a): vehicle control : 0.5 % CMC Na (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

HBA: 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               | HBA                   |                       |                      |                       |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
|                        | 0 a)                  | 40                    | 200                  | 1000                  |
| Day 0 (At birth)       |                       |                       |                      |                       |
| No. of live pups       | 13.6 $\pm$ 4.6 ( 12 ) | 12.8 $\pm$ 5.3 ( 12 ) | 15.0 $\pm$ 2.0 ( 9 ) | 12.2 $\pm$ 5.2 ( 13 ) |
| Male                   | 6.3 $\pm$ 2.7 ( 12 )  | 5.8 $\pm$ 3.2 ( 12 )  | 8.2 $\pm$ 2.5 ( 9 )  | 5.8 $\pm$ 3.3 ( 13 )  |
| Female                 | 7.3 $\pm$ 3.5 ( 12 )  | 7.0 $\pm$ 3.0 ( 12 )  | 6.8 $\pm$ 2.6 ( 9 )  | 6.4 $\pm$ 3.3 ( 13 )  |
| Weight of pup in grams |                       |                       |                      |                       |
| Male                   | 6.7 $\pm$ 0.7 ( 12 )  | 6.6 $\pm$ 0.6 ( 10 )  | 6.3 $\pm$ 0.5 ( 9 )  | 6.7 $\pm$ 0.6 ( 12 )  |
| Female                 | 6.4 $\pm$ 0.6 ( 12 )  | 6.5 $\pm$ 0.7 ( 12 )  | 6.0 $\pm$ 0.4 ( 9 )  | 6.5 $\pm$ 0.7 ( 12 )  |
| Day 4 after birth      |                       |                       |                      |                       |
| No. of live pups       | 13.4 $\pm$ 4.5 ( 12 ) | 12.6 $\pm$ 5.2 ( 12 ) | 15.0 $\pm$ 2.0 ( 9 ) | 13.1 $\pm$ 4.2 ( 12 ) |
| Male                   | 6.3 $\pm$ 2.7 ( 12 )  | 5.6 $\pm$ 3.1 ( 12 )  | 8.2 $\pm$ 2.5 ( 9 )  | 6.2 $\pm$ 3.1 ( 12 )  |
| Female                 | 7.2 $\pm$ 3.4 ( 12 )  | 7.0 $\pm$ 3.0 ( 12 )  | 6.8 $\pm$ 2.6 ( 9 )  | 6.9 $\pm$ 2.7 ( 12 )  |
| Weight of pup in grams |                       |                       |                      |                       |
| Male                   | 10.3 $\pm$ 1.5 ( 12 ) | 9.9 $\pm$ 1.4 ( 10 )  | 9.8 $\pm$ 0.8 ( 9 )  | 10.2 $\pm$ 1.0 ( 11 ) |
| Female                 | 10.1 $\pm$ 1.8 ( 12 ) | 9.7 $\pm$ 1.3 ( 12 )  | 9.3 $\pm$ 0.8 ( 9 )  | 10.1 $\pm$ 1.0 ( 12 ) |

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

Parenthesis indicates the number of litters evaluated