

動であったことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。また、0.5 mg/kg 群の雄で無機リンの高値がみられたが、高用量群に同様な変動はみられなかったことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。

7. 剖検

検査結果を Table 11, 12 および Appendix 21~25 に示した。

1) 投与 13 週終了時

2.5 mg/kg 群の雄 5 例, 12.5 mg/kg 群の雌 1 例で肝臓の肥大が認められた。

そのほか、12.5 mg/kg 群の雌で皮膚の脱毛が認められたが、1 例のみの限局した変化であったことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。また、0.5 mg/kg 群の雌 1 例で腎盂拡張が認められたが、高用量群に同様な変化みられていないことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。また、対照群のみの変化として、雄 1 例で腎臓の小陥凹、雌 1 例で胸腺の暗赤色化、ほかの雌 1 例で腎臓の灰白色腫瘍が認められた。

2) 投与 52 週終了時

投与 13 週終了時と同様な変化として、2.5 mg/kg 群の雄 9 例, 12.5 mg/kg 群の雌 5 例で肝臓の肥大が認められた。更に、肝臓の肥大は 0.5 mg/kg 群の雄 7 例にも認められた。

投与 13 週終了時にみられなかった変化として、2.5 mg/kg 群の雄 2 例と 12.5 mg/kg 群の雌 1 例で肝臓の灰白色斑が認められた。

そのほか、肺の暗赤色化、精巣および精巣上体の小型化、前立腺の暗赤色点、2.5 mg/kg 群の雄にみられ、肝臓の暗赤色斑が 2.5 mg/kg 群の雌 1 例と 2.5 mg/kg 群の雄 1 例に、下垂体の灰白色結節が 2.5 および 12.5 mg/kg 群の雌に、卵巣囊の拡張および子宮の内膜ポリープが 12.5 mg/kg 群の雌にみられたが、これらの変化はいずれも 1 例のみの軽度な変化であったことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。また、対照群を含む各投与群の雄ないし雌で胼胝（後肢）が散見され、胼胝に伴う後肢の腫脹あるいは膝窩リンパ節の肥大を示す例も認められた。さらに、胸腺の小型化が対照群を含む各投与群の雌雄に、肺の白色点に対照群の雌雄と 2.5 mg/kg 群の雄に、脾臓の灰白色斑が対照および 0.1 mg/kg 群の雄に、心臓の灰白色化が対照、0.5 および 2.5 mg/kg 群の雄に、肝臓の横隔膜ヘルニアが対照および 12.5 mg/kg 群の雌に、卵巣の嚢胞、乳腺の乳汁貯留、下垂体の肥大または暗赤色点、副腎の褐色点、皮下の灰白色腫瘍または白色結節が対照群を含む各投与群の雌に、甲状腺の片側性の欠損と対側の肥大が 0.1 mg/kg 群の雄に、腎臓の小陥凹と皮膚の白色結節が 0.5 mg/kg 群の雄に、卵巣の肥大と副腎の肥大が 2.5 mg/kg 群の雌にそれぞれ認められた。これらの変化については、高用量群（雄で 2.5 mg/kg, 雌で 12.5 mg/kg）に同様な

変化がみられないか、あるいは対照群と比較してその発生頻度に明らかな差が認められなかったことから、いずれも被験物質投与との関連性はないと判断した。また、対照群のみの変化として、雄2例に肝臓の褪色が認められた。

3) 死亡例

0.5 mg/kg 群の雄1例 (No. 232) では、腎臓の灰白色腫瘍および表面の粗造化、膀胱の赤色尿の貯留、脾臓の肥大、精巣および胸腺の小型化並びに副腎の肥大が認められた。同群の残りの雄1例 (No. 238) では、前肢の淡赤色腫瘍、肝臓の褪色、腎臓表面の粗造化並びに胸腺の小型化が認められた。

2.5 mg/kg 群の雄1例 (No. 278) では、肺の暗赤色斑および胸腺の暗赤色点が認められた。

12.5 mg/kg 群の雌1例 (No. 477) では、下垂体の淡赤色腫瘍が認められ、食道壁の肥厚、前胃の穿孔および粘膜肥厚、更に穿孔部を覆うように脂肪組織が癒着していた。また、同例では乳腺の乳汁貯留並びに胸腺の小型化も認められた。

8. 器官重量の測定

測定結果を Table 13, 14 および Appendix 26~31 に示した。

1) 投与 13 週終了時

0.5 および 2.5 mg/kg 群の雄と 12.5 mg/kg 群の雌で、肝臓の絶対および相対重量の高値が認められた。また、28 日間反復投与毒性試験¹⁾と同様な変化として、2.5 mg/kg 群の雄で腎臓の相対重量の高値が認められた。

そのほか、2.5 mg/kg 群の雄で、副腎の絶対重量の低値と脳、心臓および精巣の相対重量の高値が認められたが、絶対あるいは相対重量のいずれかの変動であることから、最終体重の低値に起因した二次的変化であり、被験物質投与との関連性はないと判断した。また、甲状腺の絶対重量の高値が 0.1 mg/kg 群の雄に、精巣上体の絶対および相対重量の低値が 0.5 mg/kg 群の雄に、下垂体および甲状腺の相対重量の高値が 2.5 mg/kg 群の雌に、脾臓の絶対および相対重量の低値が 0.5 mg/kg 群の雌に認められたが、高用量群 (雄で 2.5 mg/kg, 雌で 12.5 mg/kg) に同様な変動はみられなかったことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。

2) 投与 52 週終了時

投与 13 週終了時と同様な変化として、0.5 および 2.5 mg/kg 群の雄と 12.5 mg/kg 群の雌で、肝臓の絶対および相対重量の高値が認められた。また、28 日間反復投与毒性試験¹⁾と同様な変化として、2.5 mg/kg 群の雄で腎臓の相対重量の高値が認められた。

そのほか、2.5 mg/kg 群の雄で脳、下垂体、甲状腺、心臓、肺、精巣上体および精巣重量の高

値がみられたが、相対重量のみの変動であることから、最終体重の低値に起因した二次的变化であり、被験物質投与との関連性はないと判断した。

9. 病理組織学的検査

検査結果を Table 15, 16 および Appendix 32~36 に示した。

1) 投与 13 週終了時

肝臓では、小葉中心部の軽度ないし中等度な肝細胞肥大が、雄では 0.5 mg/kg 群の 3 例と 2.5 mg/kg 群の 9 例に、雌では 12.5 mg/kg 群の 6 例にみられ、肥大した肝細胞の細胞質は好酸性顆粒状を呈していた。

そのほか、腎臓の好塩基性尿細管と腎盂の好中球浸潤が、2.5 mg/kg 群の雄に認められたが、1 例のみの軽度な変化であったことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。また、対照および高用量群 (雄で 2.5 mg/kg, 雌で 12.5 mg/kg) の雄ないし雌では、食道筋層の線維化、甲状腺の鰹後体遺残、肺胞内の泡沫細胞集積、肺動脈の鉍質沈着、心臓および前立腺の単核細胞浸潤、副腎の巣状の皮質細胞肥大が散見された。更に、肝臓では、小葉中間帯の肝細胞の脂肪変性が 0.1 mg/kg 群の雄に、肝細胞の巣状壊死が対照, 0.5 および 2.5 mg/kg 群の雄と 2.5 mg/kg 群の雌に、肝臓の単核細胞浸潤が対照, 0.1 および 0.5 mg/kg 群の雄と対照, 2.5 および 12.5 mg/kg 群の雌に認められた。これらの変化については、高用量群 (雄で 2.5 mg/kg, 雌で 12.5 mg/kg) に同様な変化がみられないか、あるいは対照群と比較してその程度および発生頻度に明らかな差が認められなかったことから、いずれも被験物質投与との関連性はないと判断した。また、対照群では、雄で腎臓の蛋白円柱、大脳側脳室の拡張、雌で小葉辺縁部の肝細胞の脂肪変性、脾臓の巣状の腺房萎縮、胸腺の出血、腎臓の皮髄境界部の鉍質沈着と腎芽腫が認められた。

2) 投与 52 週終了時

投与 13 週終了時と同様な変化として、肝臓において小葉中心部の軽度ないし中等度な肝細胞肥大が、雄では 0.5 mg/kg 群の 5 例と 2.5 mg/kg 群の 8 例に、雌では 12.5 mg/kg 群の 4 例に認められ、肥大した肝細胞の細胞質は好酸性顆粒状を呈していた。

投与 13 週終了時にみられなかった変化として、肝臓では、肝細胞への軽度なりポフスチン沈着 (シユモール反応：陽性、ベルリン青染色およびホール法：陰性) が 2.5 mg/kg 群の雄 6 例と 12.5 mg/kg 群の雌 2 例に、軽度ないし中等度な明細胞性変異肝細胞巣が 0.1 mg/kg 群の雄 1 例と 0.5 および 2.5 mg/kg 群の雄各 7 例に、軽度な囊胞状変性が 0.1 および 0.5 mg/kg 群の雄各 2 例と 2.5 mg/kg 群の雄 4 例に認められた。また、2.5 mg/kg 群の雄では、肝細胞の軽度な巣状壊死の発生頻度が、対照群と比較してやや増加する傾向が認められた (発生頻度：4/10 例)。

そのほか、2.5 mg/kg 群の雄では、誤嚥性肺炎、前立腺の出血、下垂体前葉の嚢胞、甲状腺間質への好酸性物質沈着、精巣のライディッヒ細胞の巣状過形成と精細管の萎縮および精巣上体の精子減少がみられ、12.5 mg/kg 群の雌では、腺胃粘膜の好中球浸潤、盲腸筋層の線維化、卵巢嚢の拡張、子宮の内膜間質ポリープ、甲状腺の C 細胞過形成、腎臓の尿細管上皮および腎盂移行上皮の過形成、耳下腺、膵臓並びにハーダー腺のリンパ球浸潤と気管粘膜固有層の好中球浸潤並びに大腿骨および胸骨骨髓の巣状萎縮が認められた。これらの変化については、低頻度かつ軽度な変化であったことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。

また、対照群および高用量群の雌雄ほぼ全例で胸腺の萎縮がみられ、対照群および高用量群を通して、肺胞内の泡沫細胞集積、肺動脈の鉍質沈着、心臓の単核細胞浸潤および心筋層の線維化、膵臓の巣状の腺房萎縮、腎臓の好塩基性尿細管および蛋白円柱、腎臓の皮質、腎盂あるいは腎盂腔への細胞（単核細胞ないし好中球）浸潤、腎乳頭部あるいは腎盂の鉍質沈着、甲状腺の鰓後体遺残、下垂体前葉の過形成、副腎の巣状の皮質細胞肥大と過形成が散見された。また、対照群および高用量群の雄では腺胃の腺腔拡張、膵臓の巣状の腺房細胞過形成、前立腺の萎縮と単核細胞浸潤が、雌では脾臓の赤脾髄の褐色色素沈着、卵巢の嚢胞、子宮腺上皮細胞の扁平上皮化生、腔粘膜の粘液変性、乳腺の小葉過形成、腺房／導管の拡張、副腎の血管拡張が散見されたほか、肉眼的な皮下の灰白色腫瘍または白色結節に対応して、乳腺の線維腺腫、乳腺腫および乳腺癌が認められた。更に、肝臓では、単核細胞浸潤が対照、0.1 および 2.5 mg/kg 群の雄と 12.5 mg/kg 群の雌に、小葉辺縁部の肝細胞の脂肪変性が対照群の雌雄と 0.1 mg/kg 群の雄に、血管拡張が 2.5 mg/kg 群の雄に、肝細胞腺腫が 12.5 mg/kg 群の雌に、好塩基性変異肝細胞巣が対照、2.5 および 12.5 mg/kg 群の雌に認められた。これらの変化については、高用量群（雄で 2.5 mg/kg、雌で 12.5 mg/kg）に同様な変化がみられないか、あるいは対照群と比較してその程度および発生頻度に明らかな差が認められないことから、いずれも被験物質投与との関連性はないと判断した。また、剖検時に胼胝（後肢）がみられた例では、当該部に潰瘍がみられ、潰瘍に関連して肝臓および脾臓の髓外造血、大腿骨骨髓の造血亢進並びに膝窩リンパ節の形質細胞の増加を伴う例もみられた。対照群のみの変化として、雄で膵臓のラ氏島の線維化、脾臓の被膜肥厚、腎盂の出血、膀胱筋層の好中球浸潤と精巣上体の単核細胞浸潤が認められた。

3) 死亡例

2.5 mg/kg 群の雄 1 例 (No. 278) では、肝臓の小葉中心部の軽度な肝細胞肥大、肺の軽度な出血と浮腫、胸腺の軽度な出血および下垂体後葉の軽度な嚢胞が認められたが、死因を特定するに至らなかった。

12.5 mg/kg 群の雌 1 例 (No. 477) では、下垂体前葉の腺腫が認められ、本所見が死因と判断し

た。また、同例では食道の軽度な潰瘍、前胃の軽度な穿孔性潰瘍、胸腺の中等度な萎縮、脾臓の白脾髄の軽度な萎縮および赤脾髄の軽度な褐色色素沈着、卵巣の軽度な萎縮、腔内腔への軽度な好中球滲出、乳腺の腺房／導管の中等度な拡張が認められた。

0.1 mg/kg 群の雄 1 例 (No. 232) では、腎芽腫が認められ、本所見が死因と判断した。また、同例では胸腺の重度な萎縮、腸間膜リンパ節の軽度な萎縮、脾臓の軽度な白脾髄の萎縮と髓外造血、大腿骨および胸骨骨髓の軽度な造血亢進、副腎束状帯の軽度なびまん性皮質細胞肥大、大動脈の中膜および腎臓皮質の中等度な鉍質沈着、肺胞内の軽度な泡沫細胞集積、精巣の軽度な精細管萎縮、軽度な前立腺炎、甲状腺の軽度な鰓後体遺残が認められた。

0.1 mg/kg 群の残りの雄 1 例 (No. 238) では、前肢に横紋筋肉腫が認められ、本所見が死因と判断した。また、同例では肝臓の小葉中心部の軽度な肝細胞空胞化と壊死、胸腺の中等度な萎縮、脾臓の軽度な髓外造血、大腿骨および胸骨骨髓の軽度な造血亢進、腺胃の軽度なびらん、腎臓の中等度な好塩基性尿細管、心臓の軽度な単核細胞浸潤が認められた。

考 察

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールをラットに雄は0(対照群), 0.1, 0.5 および 2.5 mg/kg, 雌は0(対照群), 0.5, 2.5 およ 12.5 mg/kg の用量で13 または 52 週間反復経口投与した。

投与期間を通して、被験物質投与に起因した死亡の発生および一般状態の異常所見は認められなかった。

肝臓では、投与13 および 52 週終了時に、0.5 および 2.5 mg/kg 群の雄と 12.5 mg/kg 群の雌で重量の高値がみられ、2.5 mg/kg 群の雄と 12.5 mg/kg 群の雌で肥大、0.5 および 2.5 mg/kg 群の雄と 12.5 mg/kg 群の雌で小葉中心部の肝細胞肥大が認められた。また、52 週間投与終了時に、2.5 mg/kg 群の雄と 12.5 mg/kg 群の雌で灰白色斑がみられ、2.5 mg/kg 群の雄と 12.5 mg/kg 群の雌で肝細胞へのリポフスチン沈着、0.1, 0.5 および 2.5 mg/kg 群の雄で明細胞性変異肝細胞巣と嚢胞状変性の発現例数の増加が認められた。更に、肝機能に関連すると思われる変化として、投与13 ないし 52 週終了時に、0.5 および 2.5 mg/kg 群の雄と 12.5 mg/kg 群の雌で、血清の A/G 比、アルブミン百分比、ALP あるいはグルコースの高値ないし高値傾向と α_1 、 α_2 あるいは β -グロブリンの低値がみられ、12.5 mg/kg 群の雌では総蛋白質の高値も認められた。また、2.5 mg/kg 群の雄では、凝固系検査で PT および APTT の延長ないし延長傾向も認められた。上述の肝細胞肥大については、薬物代謝酵素の誘導による滑面小胞体の増加やペルオキシゾームの増加などで生じることが知られている³⁾。本試験でみられた肝細胞肥大は、小葉中心部にみられていること、かつ肥大した肝細胞の細胞質が好酸性顆粒状を呈していたことから、ペルオキシゾームの増加の可能性が考えられた。また、肝細胞へのリポフスチン沈着、変異肝細胞巣および嚢胞状変性については、健常動物においても加齢性変化として低頻度ながら観察されるが、本試験では対照群に同様の変化がないか、あるいは高用量群でその発現例数が有意に増加したことから、被験物質投与との関連性が考えられた。しかし、ペルオキシゾーム誘導剤(クロフィブレートに代表される抗脂血症剤やフタル酸エステルなどの可塑剤)の長期投与によって肝細胞のリポフスチンの増加がみられ、更に、げっ歯類では肝細胞腫瘍の発生頻度が増加することが知られている^{3,4)}。本試験においても、被験物質投与による肝細胞のペルオキシゾーム増加の可能性が13 週間の投与時点から示唆されていること、また、リポフスチン沈着、変異肝細胞巣および嚢胞状変性は13 週間の投与ではみられず、52 週間の長期投与で発現したことから、これらの変化はペルオキシゾームの増加に伴って二次的に生じた可能性が推察された。なお、げっ歯類における肝発がんを誘発するペルオキシゾーム誘導剤に関しては、直接 DNA に対して傷害を与えない非遺伝毒性(非変異原性)発がん物質と考えられており、これらの長期投与で生じる肝発がんはげっ歯類特有の変化であること

が示唆されている^{5, 6, 7)}。上述した変化に加えて、高用量群の雄では、肝細胞巣状壊死の発現例数の増加傾向がみられ、被験物質投与との関連性が疑われたが、肝細胞肥大 (ペルオキシゾームの増加が窺われる変化) との関連については明らかでなかった。

上述のほか、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査および器官重量において、28日間反復投与毒性試験¹⁾と同様な変化が認められた。すなわち、体重の低値が、2.5 mg/kg 群の雄で投与36日以降に、摂餌量の高値が、2.5 mg/kg 群の雄で投与120日以降に認められた。また、血小板数の高値が、2.5 mg/kg 群の雄と12.5 mg/kg 群の雌で投与13あるいは52週終了時に、赤血球数、ヘマトクリット値あるいはヘモグロビン量の低値が、0.5 および2.5 mg/kg 群の雄で投与13 および52週終了時にみられ、BUNの高値が、0.5 および2.5 mg/kg 群の雄で投与13あるいは52週終了時に認められた。更に、腎臓重量 (相対重量) の増加が、2.5 mg/kg 群の雄で投与13 および52週終了時に認められた。そのほか、本試験では、上述のBUNの高値や腎臓重量の高値との関連性が考えられる変化として、0.5 および2.5 mg/kg 群の雄で尿浸透圧あるいは尿比重の高値が投与13 および52週時に認められた。これらの尿パラメータの変動については、28日間反復投与毒性試験において同様な変化は認められていないことから¹⁾、長期投与による影響を示唆するものと考えられた。なお、12.5 mg/kg 群の雌では、尿量の高値と本変化に伴う尿浸透圧の低値が投与52週時にみられたが、血液生化学的検査および病理組織学的検査において、本変化に関連する異常所見は何ら認められなかったことから、毒性学的意義に乏しい変化と捉えている。

以上のことから、本試験条件下における2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールの52週間反復投与における無影響量 (NOEL) は、雄では肝臓への病理組織学的影響と血清の蛋白、グルコースおよびALPの変動、尿パラメータの変動とBUNの変動、並びに赤血球系パラメータの変動がみられなかった0.1 mg/kg/dayであり、雌では肝臓への病理組織学的影響と血清の蛋白、グルコースおよびALPの変動、並びに血小板数の変動がみられなかった2.5 mg/kg/dayと判断した。

文 献

- 1) 渡 修明ら: 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールのラットを用いる 28 日間反復投与毒性試験, 化学物質毒性試験報告, 10, 221-236 (2003).
- 2) 木原 正志ら: トウモロコシ油中 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールの安定性試験, 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ, 試験番号: P030691 (2003).
- 3) 日本毒性病理学会編: 肝/胆嚢, 毒性病理組織学 各論 5 章, pp.179-213. 日本毒性病理学会, 名古屋 (2000).
- 4) P. Greaves ed.: Digestive system 2 Liver, *Histopathology of preclinical toxicity studies* Chap. 8, pp.393-441. Elsevier, Amsterdam (1990).
- 5) 国立医薬品食品衛生研究所編: 【3】ヒトへの外挿, 化学物質のリスクアセスメント -現状と問題点- 第3章, pp.52-58. 株式会社薬業時報社, 東京 (1997).
- 6) Roberts RA.: Peroxisome proliferators: mechanisms of adverse effects in rodents and molecular basis for species differences. *Archives of Toxicology* 73, pp. 413-418 (1999).
- 7) Silva Lima B, et al.: Mechanisms of nongenotoxic carcinogenesis and assessment of the human hazard. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32 (2), pp. 135-143 (2000).

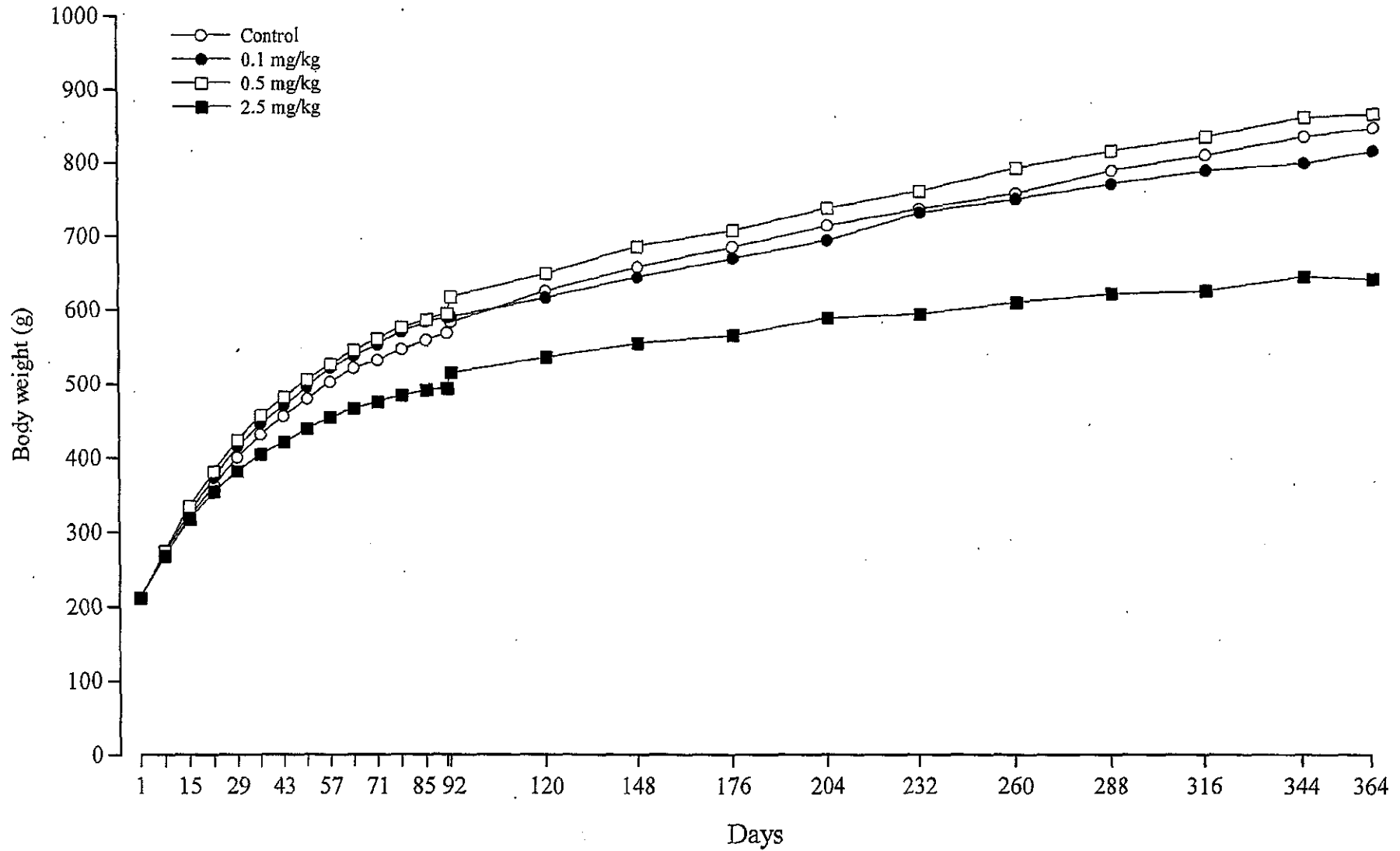


Figure 1 Body weight changes (Male)

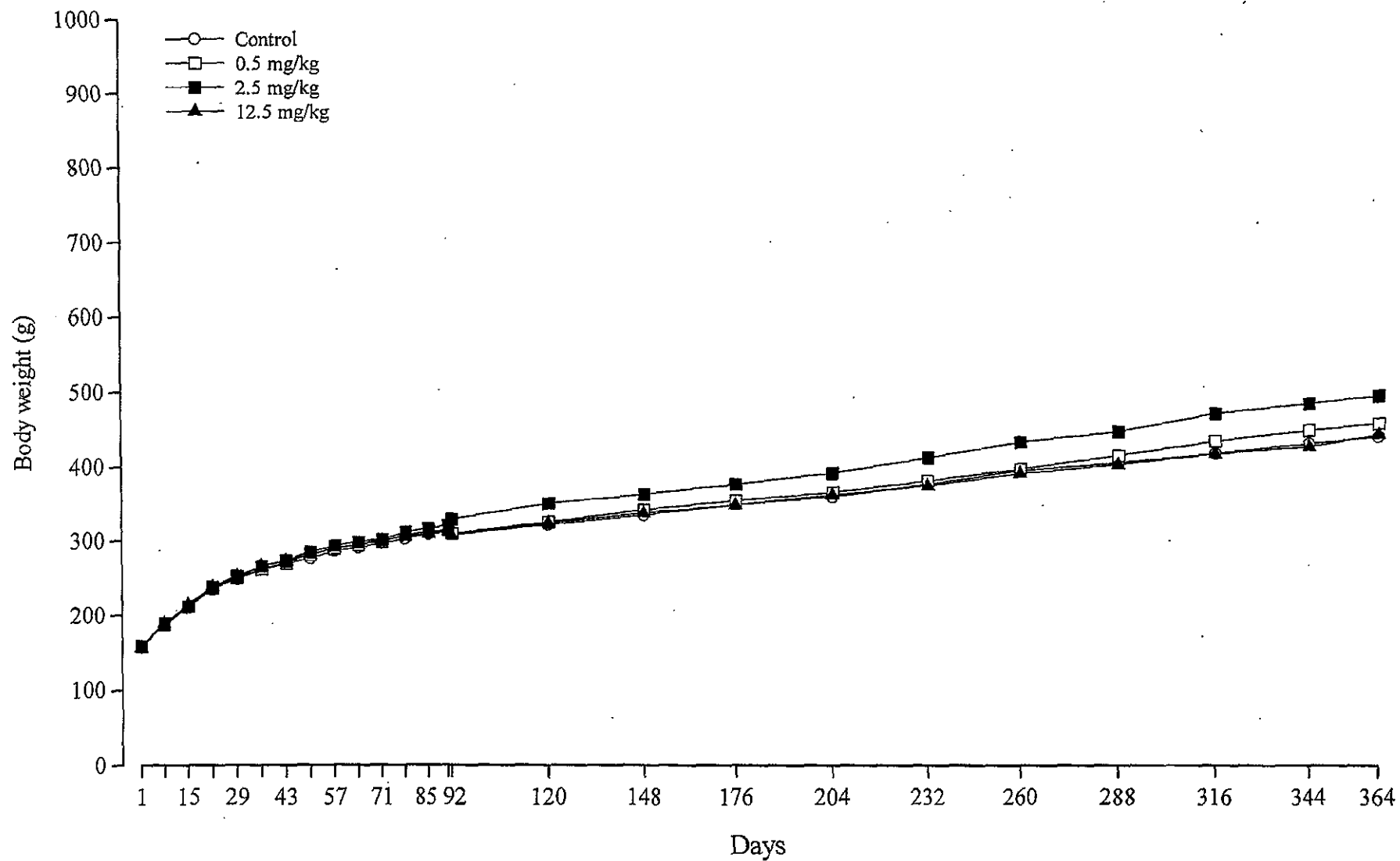


Figure 2 Body weight changes (Female)

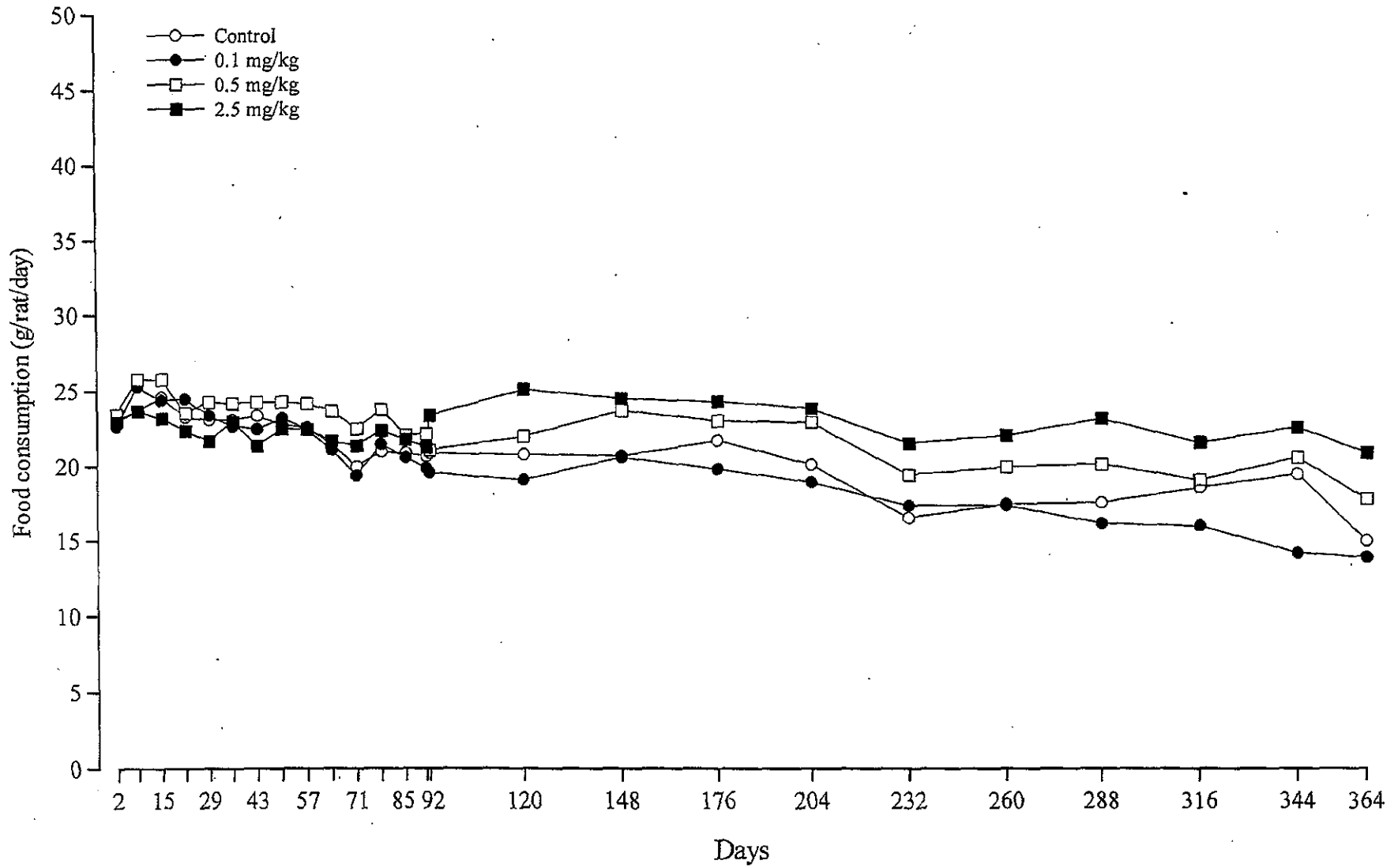


Figure 3 Food consumption (Male)

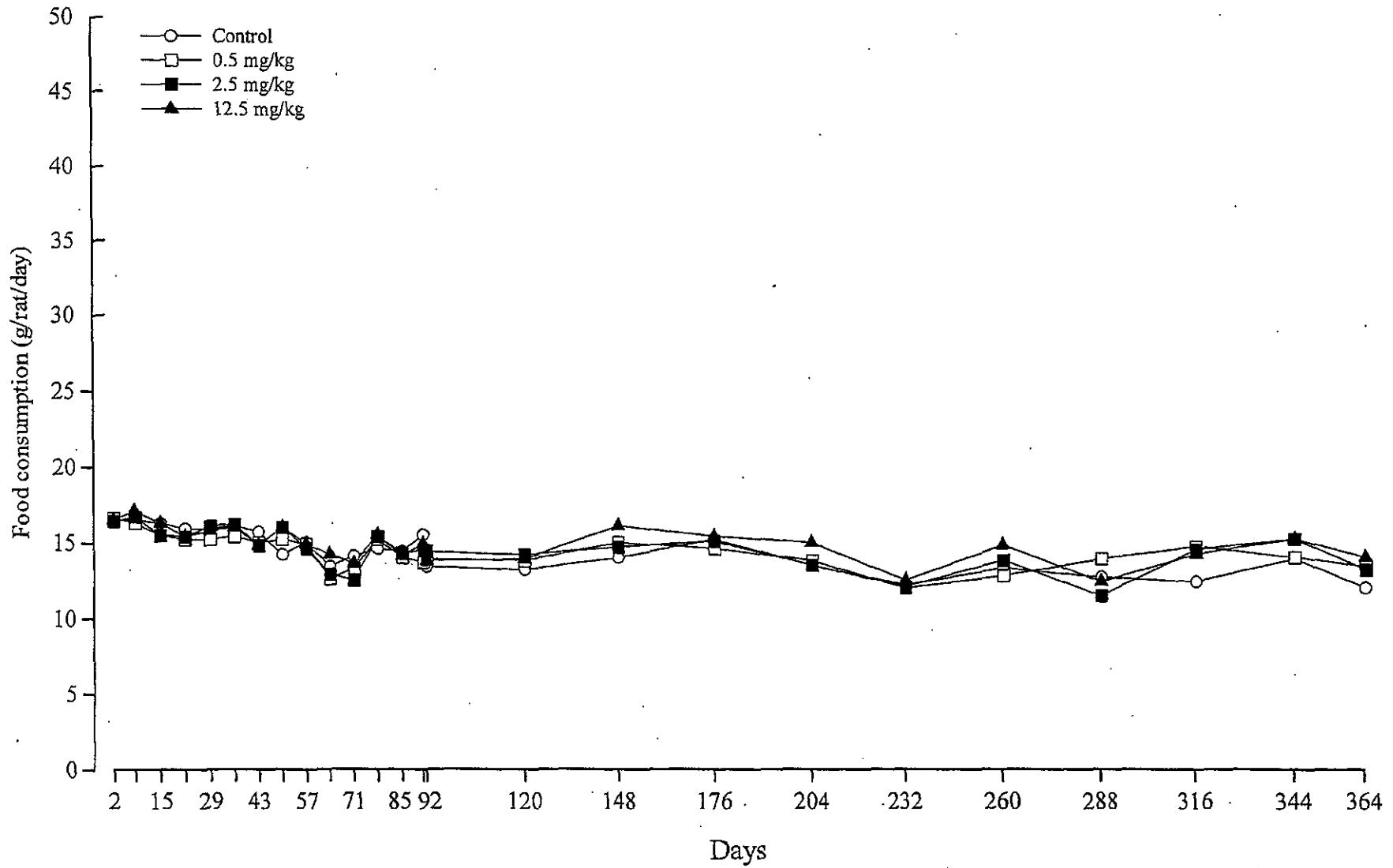


Figure 4 Food consumption (Female)

Table 1 Incidence of clinical signs
Male

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Male	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Emaciation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.5 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abnormality of tooth		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2.5 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued Incidence of clinical signs
Male

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
Male	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Emaciation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.5 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Abnormality of tooth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2.5 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued Incidence of clinical signs
Male

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
Male	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Emaciation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.5 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
No abnormality		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2.5 mg/kg	Abnormality of tooth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued Incidence of clinical signs
Male

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
Male	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Emaciation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.5 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Abnormality of tooth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2.5 mg/kg	Number of examined	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	
	No abnormality	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued Incidence of clinical signs
Male

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
Male	Control	Number of examined	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Emaciation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.5 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	20	20	20	20	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Abnormality of tooth	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
2.5 mg/kg	Number of examined	19	19	19	19	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	19	19	19	19	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued Incidence of clinical signs
Male

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	9	9	9	9	10	9	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Emaciation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.5 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Abnormality of tooth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2.5 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	