

Table 4 Body weight gain of female rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Days of administration (Pre-mating period)				
1~8	15.8 ± 4.2 (13)	17.6 ± 3.7 (13)	13.1 ± 3.8 (13)	-11.1 ± 21.6** (13)
8~15	18.2 ± 6.4 (13)	19.9 ± 7.4 (13)	21.3 ± 6.2 (13)	24.2 ± 11.6 (12)
Days of pregnancy				
0~7	37.2 ± 3.6 (11)	36.7 ± 6.4 (10)	38.2 ± 4.0 (11)	35.9 ± 6.1 (9)
7~14	38.3 ± 4.6 (11)	36.1 ± 7.3 (10)	35.3 ± 5.6 (11)	37.4 ± 5.2 (9)
14~20	65.8 ± 12.9 (11)	62.7 ± 15.2 (10)	62.6 ± 18.6 (11)	66.2 ± 12.6 (9)
Days of lactation				
0~4	17.3 ± 16.0 (11)	31.4 ± 15.8 (9)	16.1 ± 14.3 (10)	6.4 ± 28.6 (7)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

** : significant difference from control, p<0.01

Table 5 Food consumption of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Days of administration				
1~8	170.9 ± 16.9 (13)	172.5 ± 17.2 (13)	150.2 ± 30.4 (13)	122.5 ± 12.6** (13)
8~15	166.0 ± 19.9 (13)	160.1 ± 23.0 (13)	153.8 ± 25.6 (13)	165.0 ± 19.2 (13)
29~36	147.0 ± 14.0 (13)	148.9 ± 14.7 (13)	153.4 ± 17.8 (13)	163.2 ± 22.5 (13)
36~42	124.4 ± 13.4 (13)	118.4 ± 14.0 (13)	125.1 ± 14.1 (13)	141.2 ± 20.8* (13)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, p<0.05

** : significant difference from control, p<0.01

Table 6 Food consumption of female rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Days of administration (Pre-mating period)				
1~8	119.0 ± 7.6 (13)	116.7 ± 5.3 (13)	109.7 ± 12.3 (13)	74.5 ± 22.9** (13)
8~15	118.9 ± 8.9 (13)	117.1 ± 8.5 (13)	121.1 ± 10.3 (13)	126.7 ± 8.6 (12)
Days of pregnancy				
0~7	139.0 ± 5.5 (11)	137.5 ± 11.3 (10)	142.9 ± 10.9 (11)	136.2 ± 14.0 (9)
7~14	154.5 ± 6.8 (11)	150.0 ± 13.3 (10)	154.2 ± 11.2 (11)	150.8 ± 13.0 (9)
14~20	130.3 ± 6.5 (11)	128.0 ± 15.2 (10)	129.8 ± 10.1 (11)	133.3 ± 14.8 (9)
Days of lactation				
0~4	91.8 ± 14.5 (11)	99.4 ± 16.9 (9)	80.3 ± 31.2 (10)	65.6 ± 35.7 (7)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

** : significant difference from control, p<0.01

日の増加量は再びやや低値の傾向を示した。

雌では、100 mg/kg以下の投与群では、いずれの時期の体重および摂餌量にも対照群と比較して有意差は認められなかった。400 mg/kg投与群では、交配前の投与1～8日の摂餌量が対照群と比較して有意($p<0.01$)な低値を示し、体重が減少した。投与8～15日の摂餌量には、対照群との間に有意差は認められず、体重増加抑制も認められなくなったが、投与開始後の各時期の体重は対照群と比較して有意($p<0.01$)な低値を示した。妊娠期の摂餌量には対照群との間で有意差は認められなかったが、交配前の体重が低値であったために、妊娠0～14日の体重が対照群と比較して有意($p<0.05$, $p<0.01$)な低値を示した。哺育期には、哺育0～4日の摂餌量がやや低値の傾向を示したが、体重および摂餌量ともに対照群との間に有意差は認められなかった。

100 mg/kg投与群の1例の体重は、後述のII-1-2)分娩および哺育状態の項に記載した理由により評価の対象から除外した。

3) 尿検査所見

25 mg/kg投与群の尿検査所見は対照群と同様であった。100 mg/kg以上の投与群では、pHがアルカリに傾く動物が増加し、400 mg/kg投与群では、13例中11例が9以上を示した。その他の検査項目は、対照群と同様であった。

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) 血液学検査所見 (Table 7)

赤血球については、100 mg/kg以上の投与群において血色素量および平均赤血球血色素濃度が、軽度ではあるが用量依存的に有意($p<0.05$, $p<0.01$)に低下した。また、400 mg/kg投与群では、平均赤血球血色素量が有意($p<0.01$)に減少した。ヘマトクリット値は、すべてのチオフェン投与群が対照群と比較して有意($p<0.05$, $p<0.01$)な低値を示したが、その程度は生理的変動の範囲内であった。その他の項目については対照群とチオフェン各投与群との間に有意差は認められなかった。

白血球については、数および百分比のいずれにも対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。

血液凝固に関連した検査項目では、400 mg/kg投与群においてAPTTが有意($p<0.05$)に短縮したが、PTについてはいずれのチオフェン投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

(2) 血液生化学検査所見 (Table 8)

対照群と比較して、100 mg/kg以上の投与群においてブドウ糖濃度が有意($p<0.01$)に減少した。また、無機リン濃度が有意($p<0.01$)に増加し、アルカリフォスファターゼ活性が有意($p<0.01$)に低下した。さらに、400 mg/kg投与群では、尿素窒素、総コレステロールおよび総ビリルビンの各濃度、ならびにGPT, GOTおよび γ -GTPの各活性がそれぞれ対照群と比較して有意

($p<0.05$, $p<0.01$)に上昇した。これらはいずれもチオフェンの用量に依存して変化した。このほか、ナトリウム濃度がチオフェン各投与群において、また、カリウムおよび塩素濃度が25 mg/kg投与群において有意($p<0.05$, $p<0.01$)な高値を示したが、いずれも用量に依存した変化ではなかった。総蛋白濃度、アルブミン濃度、A/G比、クレアチニン濃度およびカルシウム濃度については、対照群とチオフェン各投与群との間に有意差は認められなかった。

(3) 器官重量 (Table 9)

25 mg/kg投与群では、重量および比体重値ともに対照群との間に有意差の認められる器官はなかった。100 mg/kg以上の投与群において肝臓および腎臓の比体重値が有意($p<0.01$)な高値を示した。また、400 mg/kg投与群では、脾臓重量が有意($p<0.01$)な低値を示した。400 mg/kg投与群における精巣上体重量は対照群と同様であったが、解剖時体重が対照群と比較して有意($p<0.01$)な低値を示したことから、比体重値が対照群と比較して有意($p<0.05$)な高値を示した。胸腺、精巣および甲状腺については、重量および比体重値ともに対照群との間で有意差は認められなかった。

(4) 剖検所見

肝臓では400 mg/kg投与群において2例に暗赤色化が、また、1例に退色がみられた。腫大は、チオフェン各投与群の1例ずつに認められ、黄色化が、対照群の4例、25 mg/kg投与群の5例、100 mg/kg投与群の3例および400 mg/kg投与群の1例にみられた。このほか、対照群の2例、25および100 mg/kg投与群の各4例、400 mg/kg投与群の1例に肝小葉の明瞭化がみられた。

腎臓では、400 mg/kg投与群に皮質の陥凹および退色が1例みられ、100 mg/kg投与群に腎乳頭の赤色化が1例みられた。また、25および100 mg/kg投与群の各1例、対照群の3例に腎盂の拡張が認められた。

肺では、対照群、100、および400 mg/kg投与群の各1例に暗赤色点、対照群の2例に灰白色域、1例に白色点がみられた。

甲状腺では100および400 mg/kg投与群の各2例に腫大、25 mg/kg投与群の1例に萎縮が認められた。

以上のほかに、対照群では胸腺の赤色点、心臓の白色点および精囊の萎縮が各1例にみられ、25 mg/kg投与群では副腎の腫大が2例に、100 mg/kg投与群では精巣上体の結節が1例にみられ、400 mg/kg投与群では、脾臓の萎縮を伴う退色、精巣および精巣上体の萎縮が各1例にみられた。また、100 mg/kg投与群では、水頭症が観察された。

(5) 病理組織検査所見 (Table 10)

各器官における観察所見を以下に示す。

(小脳)

400 mg/kg投与群の1例に、IIIおよびVI～X葉の顆粒細胞層に限局して、顆粒細胞の核濃縮を伴うごく軽度な壊死が認められたが、白質板および分子層に変化は認められなかった。

Table 7 Hematology of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Male								
Red blood cells								
Count ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	804 ± 39	(13)	770 ± 42	(13)	769 ± 31	(13)	788 ± 37	(13)
Hemoglobin (g/dl)	15.4 ± 1.0	(13)	14.7 ± 0.5	(13)	14.3 ± 0.4**	(13)	14.0 ± 0.4**	(13)
Hematocrit (%)	43.5 ± 2.2	(13)	41.9 ± 1.6*	(13)	41.5 ± 1.3**	(13)	41.4 ± 1.1**	(13)
M C V (μm^3)	54.2 ± 1.6	(13)	54.5 ± 2.3	(13)	54.1 ± 1.8	(13)	52.5 ± 2.1	(13)
M C H (pg)	19.2 ± 0.5	(13)	19.1 ± 0.9	(13)	18.6 ± 0.6	(13)	17.8 ± 0.7**	(13)
M C H C (%)	35.4 ± 0.8	(13)	35.1 ± 0.6	(13)	34.5 ± 0.5*	(13)	34.0 ± 0.2**	(13)
White blood cells								
Count ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	68 ± 15	(13)	56 ± 10	(13)	59 ± 15	(13)	62 ± 17	(13)
Band neutrophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 1	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Segmented neutrophil (%)	15 ± 7	(13)	16 ± 7	(13)	18 ± 6	(13)	11 ± 5	(13)
Eosinophil (%)	1 ± 1	(13)	1 ± 2	(13)	0 ± 1	(13)	1 ± 1	(13)
Basophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Monocyte (%)	3 ± 2	(13)	3 ± 2	(13)	3 ± 2	(13)	3 ± 2	(13)
Lymphocyte (%)	81 ± 7	(13)	79 ± 8	(13)	79 ± 7	(13)	86 ± 6	(13)
Platelet								
Count ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	99.7 ± 13.1	(13)	98.5 ± 27.2	(13)	99.0 ± 10.9	(13)	102.1 ± 11.7	(13)
Coagulation time								
P T (sec)	15.3 ± 1.1	(5)	16.4 ± 2.4	(5)	15.4 ± 1.5	(5)	14.6 ± 1.4	(5)
A P T T (sec)	24.9 ± 1.5	(5)	23.7 ± 1.6	(5)	23.9 ± 1.9	(5)	21.8 ± 0.6*	(5)

Values are expressed as Mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

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

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

Table 8 Blood chemistry of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Total protein (g/dl)	5.5 ± 0.3	(13)	5.5 ± 0.2	(13)	5.6 ± 0.2	(13)	5.5 ± 0.2	(13)
Albumin (g/dl)	3.1 ± 0.1	(13)	3.1 ± 0.1	(13)	3.1 ± 0.1	(13)	3.1 ± 0.1	(13)
A/G	1.33 ± 0.15	(13)	1.28 ± 0.20	(13)	1.21 ± 0.07	(13)	1.26 ± 0.14	(13)
B U N (mg/dl)	13 ± 2	(13)	14 ± 2	(13)	14 ± 2	(13)	16 ± 3**	(13)
Creatinine (mg/dl)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.0	(13)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.1	(13)
Glucose (mg/dl)	147 ± 12	(13)	132 ± 9	(13)	114 ± 8**	(13)	120 ± 18**	(13)
Total cholesterol (mg/dl)	39 ± 6	(13)	35 ± 6	(13)	45 ± 7	(13)	51 ± 9**	(13)
Total bilirubin (mg/dl)	0.08 ± 0.03	(13)	0.08 ± 0.02	(13)	0.09 ± 0.01	(13)	0.17 ± 0.05**	(13)
Na (mEq/l)	143.7 ± 1.2	(13)	145.5 ± 0.8**	(13)	145.7 ± 0.8**	(13)	145.2 ± 0.7**	(13)
K (mEq/l)	3.90 ± 0.17	(13)	4.09 ± 0.17*	(13)	3.88 ± 0.15	(13)	3.98 ± 0.20	(13)
Cl (mEq/l)	108.6 ± 1.2	(13)	110.4 ± 1.1**	(13)	108.9 ± 1.0	(13)	108.6 ± 0.8	(13)
Ca (mg/dl)	8.6 ± 0.4	(13)	8.7 ± 0.2	(13)	8.8 ± 0.2	(13)	8.6 ± 0.2	(13)
Inorg. phos. (mg/dl)	5.5 ± 0.5	(13)	5.9 ± 0.4	(13)	6.2 ± 0.4**	(13)	6.5 ± 0.4**	(13)
A L P (U/l)	273 ± 36	(13)	254 ± 43	(13)	222 ± 41**	(13)	200 ± 20**	(13)
G P T (U/l)	30 ± 6	(13)	27 ± 5	(13)	30 ± 4	(13)	81 ± 100**	(13)
G O T (U/l)	61 ± 11	(13)	56 ± 8	(13)	58 ± 6	(13)	96 ± 69*	(13)
γ -GTP (U/l)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 1	(13)	1 ± 1**	(13)

Values are expressed as Mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

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

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

(肝臓)

100 mg/kg投与群において、小葉中心部の肝細胞の肥大が7例、マクロファージの浸潤が4例にみられたが、小葉中心性の肝細胞壊死は認められなかった。400 mg/kg投与群では、全例に軽度またはごく軽度な小葉中心性の肝細胞壊死と肝細胞の軽度な肥大が認められ、そのうちの11例に肝細胞細胞質の均質化または小空胞化とマクロファージの浸潤が認められた。小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化が観察された例のうちの2例についてOil red O染色を行ったが、小空胞化した肝細胞には染色性を示す顆粒はほとんど認められなかった。その他、対照群およびチオフェン投与群に小肉芽腫や小葉中心性および周辺性の肝細胞の脂肪化がみられたが、対照群とチオフェン各投与群との間に頻度および程度の差は見られなかった。

(腎臓)

Eosinophilic bodyが対照群の1例、25 mg/kg投与群の8例、100 mg/kg投与群の6例および400 mg/kg投与群の5例に認められたが、400 mg/kg投与群では、他の投与群と比較してより多数のeosinophilic bodyが認められた。また、対照群では12例、25および100 mg/kg投与群では各10例および400 mg/kg投与群では7例に萎縮および再生性の尿細管がみられたが、対照群とチオフェン各投与群との間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、腎盂の拡張が、対照群の4例ならびに、25および100 mg/kg投与群の各1例にみられ、間質内のリンパ球の浸潤が、対照群の2例および25 mg/kg投与群の1例に認められた。また、対照群では、髄質のごく少数の尿細管内に硝子円柱が2例にみられ、皮髄境界部にごく軽度なカルシウム沈着が1例にみられた。25 mg/kg投与群では腎盂に移行上皮の限局性の軽度な過形成が1例にみられ、100 mg/kg投与群では皮質の尿細管のごく軽度な拡張が1例にみられた。

(肺)

対照群の4例および400 mg/kg投与群の2例の動脈壁にカルシウム沈着、対照群の9例および400 mg/kg投与群の2例に肺胞内の泡沫細胞の集簇がみられ、そのうち対照群の3例ではマクロファージ、好中球およびリンパ球の浸潤を伴う肺炎が認められた。

(脾臓)

対照群および400 mg/kg投与群の全例に髄外造血および色素沈着がみられた。

(心臓)

対照群の4例および400 mg/kg投与群の1例に限局性のごく軽度な心筋壊死がみられた。

(膀胱)

対照群の1例および400 mg/kg投与群の2例に粘膜上皮のごく軽度なびまん性の過形成がみられた。

(精巣上体)

対照群の1例および400 mg/kg投与群の3例にごく軽度なリンパ球の浸潤が、また、対照群の1例に軽度な精子肉芽腫がみられたが、400 mg/kg投与群と対照群との間に程度および頻度の差は認められなかった。400

mg/kg投与群の1例に精細管内生殖細胞の壊死・変性が認められた。

(精巣)

400 mg/kg投与群の1例の精細管が萎縮し、生殖細胞が減少しており、間質細胞のごく軽度な過形成がみられ、その例の精巣上体では管腔内に壊死および変性した生殖細胞がみられた。

(大脳、胸腺、甲状腺、副腎および脊髄)

いずれの投与群にも変化はみられなかった。

B. 雌〔解剖日：瀕死屠殺日、哺育4日(出生児生存)、哺育4日(全出生児死亡)、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

肝臓では、色調の変化がチオフェン各投与群で観察された。25および100 mg/kg投与群では、暗赤色化が少数に観察されたが、400 mg/kg投与群では、暗赤色化が4例に観察された他に、灰白色および黄色域が3例に、また、赤色域が2例に観察された。400 mg/kg投与群の瀕死屠殺例では、前記の赤色域の他に黄色化も観察された。小葉の明瞭化も400 mg/kg投与群の瀕死屠殺例を含むチオフェン各投与群に少数例ずつ観察された。このほか、400 mg/kg投与群では腫大が1例に認められた。また、25 mg/kg投与群では横隔膜ヘルニアが1例に認められた。

胸腺では、チオフェン各投与群の分娩例および400 mg/kg投与群の瀕死屠殺例に萎縮が観察された。25 mg/kg投与群では、2例と少なかったが、100 mg/kg投与群では4例、400 mg/kg投与群では6例と用量の増加に伴って増加した。このほか、対照群の1例に赤色点のみられた。

脾臓では100 mg/kg投与群の1例、瀕死屠殺例を含む400 mg/kg投与群の4例に萎縮が認められ、対照群では陥凹部が、また、400 mg/kg投与群では濾胞の不明瞭化がそれぞれ1例ずつにみられた。

肺では、25 mg/kg投与群の2例に暗赤色点が認められた。

副腎では、対照群に暗調の混濁化が、また、100 mg/kg投与群に腫大がそれぞれ1例に認められた。

腹部および陰部の被毛の汚れは、100 mg/kg投与群の2例および、瀕死屠殺した400 mg/kg投与群の1例に認められた。

その他、対照群では、前胃に黄色物沈着が、25 mg/kg投与群では、脾臓の赤色化が、100 mg/kg投与群では、腎臓皮質の退色化が、それぞれ1例に認められた。また、100 mg/kg投与群の全胚死亡例では、子宮の暗赤色化および肥厚、ならびに臍に暗赤色液の貯留が認められた。400 mg/kg投与群では、甲状腺の腫大が1例に認められた。また、瀕死屠殺した400 mg/kg投与群の動物には、顎下腺の萎縮、腎臓髄質の赤色化、腺胃にヘマチンの付着、胃および腸管の内容物の著しい減少が認められた。

(2) 器官重量(Table 9)

哺育4日出生児生存例では、100 mg/kg以下の投与群

Table 9 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Male	Final body weight (g)	439.7 ± 33.9 (13)	445.1 ± 43.7 (13)	419.7 ± 40.6 (13)	381.4 ± 41.5** (13)
	Liver (g)	12.49 ± 1.27 ^a (13)	13.04 ± 1.84 (13)	13.00 ± 1.76 (13)	13.56 ± 1.61 (13)
		2.84 ± 0.17 ^b	2.92 ± 0.17	3.09 ± 0.17**	3.55 ± 0.16**
	Kidneys (g)	2.65 ± 0.25 (13)	2.78 ± 0.30 (13)	2.89 ± 0.39 (13)	2.65 ± 0.33 (13)
		0.60 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.69 ± 0.04**	0.69 ± 0.04**
	Thymus (mg)	346.7 ± 92.8 (13)	324.6 ± 57.0 (13)	305.5 ± 86.4 (13)	309.7 ± 53.2 (13)
		79.1 ± 21.1	72.9 ± 11.3	73.1 ± 21.8	82.2 ± 17.5
	Testes (g)	3.09 ± 0.20 (13)	2.96 ± 0.25 (13)	3.24 ± 0.18 (13)	2.91 ± 0.37 (13)
		0.71 ± 0.06	0.67 ± 0.08	0.78 ± 0.07	0.77 ± 0.13
	Epididymides (g)	1.09 ± 0.08 (13)	1.09 ± 0.12 (13)	1.16 ± 0.08 (13)	1.06 ± 0.11 (13)
	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.04*	
Spleen (g)	0.72 ± 0.12 (13)	0.73 ± 0.14 (13)	0.68 ± 0.14 (13)	0.54 ± 0.09** (13)	
	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.02	
Thyroid glands (mg)	15.4 ± 3.3 (13)	15.5 ± 4.2 (13)	17.8 ± 4.9 (13)	14.6 ± 4.1 (13)	
	3.5 ± 0.8	3.5 ± 0.8	4.3 ± 1.2	3.8 ± 1.1	
Female	Final body weight (g)	321.4 ± 18.1 (11)	328.5 ± 17.4 (9)	307.2 ± 26.7 (10)	294.6 ± 38.5 (7)
	Liver (g)	12.53 ± 0.79 (11)	13.21 ± 0.77 (9)	13.01 ± 1.02 (10)	13.89 ± 1.60 (7)
		3.90 ± 0.25	4.03 ± 0.19	4.26 ± 0.44	4.77 ± 0.74**
	Kidneys (g)	1.94 ± 0.13 (11)	1.88 ± 0.12 (9)	1.95 ± 0.12 (10)	2.10 ± 0.21 (7)
		0.60 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.71 ± 0.03**
Thymus (mg)	245.2 ± 114.3 (11)	204.0 ± 81.7 (9)	188.4 ± 102.8 (10)	170.8 ± 109.8 (7)	
	75.5 ± 32.6	61.4 ± 22.3	59.6 ± 28.2	55.1 ± 31.3	

Values are expressed as Mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

a: absolute weight

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

*: significant difference from control, p<0.05

**: significant difference from control, p<0.01

には、重量および比体重値ともに対照群と比較して有意差の認められた器官はなかった。400 mg/kg投与群では、肝臓および腎臓の比体重値が対照群と比較して有意(p<0.01)な高値を示した。しかし、胸腺重量については対照群との間に有意差は認められなかった。

瀕死屠殺、交尾不成立および不妊であったため、途中剖検した動物においても400 mg/kg投与群では、肝臓および腎臓の比体重値が高値の傾向を示した。また、瀕死屠殺例および全出生児死亡例では、チオフェンの用量とは無関係に胸腺重量が低値の傾向を示した。

(3) 病理組織所見 (Table 10)

各器官における観察所見を以下に示す。

(大脳)

400 mg/kg投与群で小脳に明らかな変化を示した例のうち、瀕死屠殺例を含む4例に脳室の軽度な拡張が、また、3例に脳室周囲のごく軽度な浮腫が認められた。

(小脳)

100 mg/kg投与群では、1例にごく軽度な顆粒細胞の壊死が認められたが、400 mg/kg投与群では、核濃縮を

伴う顆粒細胞の壊死が8例に認められた。さらに、400 mg/kg投与群の顆粒細胞の壊死巣付近では、白質板の壊死が7例に、また、分子層の軽度な空胞化およびブルキンエ細胞の変性または脱落が各6例にみられ、壊死巣内および周囲では脂肪顆粒細胞の浸潤が4例に、出血が4例に、また、カルシウム沈着が3例にみられた。顆粒細胞、白質板および分子層に強い変化がみられた例の小脳核では、多数の神経細胞の空胞変性が4例に、また、軽度な浮腫が2例に認められた。顆粒細胞が著しい壊死を起こし、白質板にも明らかな壊死が認められた例の病変域はほぼ全葉に及んでおり、特に、II~IV、IXまたはX葉の顆粒細胞層では変化が強く、IIIおよびIV葉では分子層およびブルキンエ細胞にも明らかな変化がみられた。一方、小脳の変化が軽度な例では、病変部は顆粒細胞層にはほぼ限局しており、主にII、IIIまたはIX葉に変化がみられた。これらの変化は、投与8日に行った瀕死屠殺例や、不妊解剖を行った例など、試験途中で剖検した400 mg/kg投与群の非妊娠動物にも認められた。

Table 10 Histopathological findings of rats treated orally with thiophene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ [Number of animals examined] Findings, grade and number of animals	Sex: Dose (mg/kg):	male				female			
		0	25	100	400	0	25	100	400
Cerebrum		[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Dilatation of ventricle	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	+	0	0	0	0	0	0	0	4
Edema around ventricle	total	0	0	0	0	0	0	0	3
	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
Cerebellum		[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Pyknosis/necrosis of granular cells	total	0	0	0	1	0	0	1	8**
	±	0	0	0	1	0	0	1	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	3
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
	+++	0	0	0	0	0	0	0	3
Vacuolation in molecular layer	total	0	0	0	0	0	0	0	6
	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	4
Necrosis in laminae albae	total	0	0	0	0	0	0	0	7*
	±	0	0	0	0	0	0	0	3
	++	0	0	0	0	0	0	0	4
Hemorrhage in necrotic foci	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
Degeneration/loss of Purkinje cells	total	0	0	0	0	0	0	0	6
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0	3
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
Infiltration of fat granule cells around the necrosis	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
	+++	0	0	0	0	0	0	0	1
Calcification in necrotic foci	total	0	0	0	0	0	0	0	3
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
Vacuolar degeneration of neurons in cerebellar nuclei	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	++	0	0	0	0	0	0	0	3
	+++	0	0	0	0	0	0	0	1
Edema in cerebellar nuclei	total	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
Liver		[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Necrosis of hepatocyte in central zone	total	0	0	0	13**	0	0	3	5
	±	0	0	0	4	0	0	2	0
	+	0	0	0	9	0	0	1	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	3
	+++	0	0	0	0	0	0	0	2
Homogenous or vesicula changes of hepatocyte in central zone	total	0	0	0	11**	0	0	1	4
	±	0	0	0	1	0	0	0	0
	+	0	0	0	5	0	0	1	2
	++	0	0	0	5	0	0	0	2
Hypertrophy of hepatocyte in central zone	total	0	0	7*	13**	0	0	11**	13**
	±	0	0	7	1	0	0	10	4
	+	0	0	0	9	0	0	1	6
	++	0	0	0	3	0	0	0	3

±:very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

*:Significant difference from control, p<0.05

**:Significant difference from control, p<0.01

Table 10 (Continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex:	male				female				
		Dose (mg/kg):	0	25	100	400	0	25	100	400
Liver										
Infiltration of macrophages in central zone	total		0	0	4	11**	0	0	5	4
	±		0	0	4	3	0	0	3	2
	+		0	0	0	4	0	0	1	2
	++		0	0	0	4	0	0	1	0
Infiltration of macrophages around necrotic area	total		0	0	0	0	0	0	0	4
	+		0	0	0	0	0	0	0	2
	++		0	0	0	0	0	0	0	2
Infiltration of neutrophil in necrotic area	total		0	0	0	0	0	0	0	2
	+		0	0	0	0	0	0	0	1
	++		0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage	total		0	0	0	0	0	0	0	3
	+		0	0	0	0	0	0	0	3
Fatty change of hepatocyte in central zone	total		13	13	13	13	5	6	9	12*
	±		10	11	4	10	5	6	8	11
	+		3	2	9	3	0	0	1	1
Fatty change of hepatocyte in peripheral zone	total		13	13	13	13	13	13	13	13
	±		0	0	0	0	6	8	7	9
	+		5	5	7	6	6	4	5	3
	++		8	8	6	7	1	1	1	1
Microgranuloma	total		13	13	13	10*	13	9	12	10
	±		7	11	8	10	12	9	10	9
	+		6	2	5	0	1	0	2	1
Infiltration of lymphocytes	total		0	0	0	0	1	0	0	0
	±		0	0	0	0	1	0	0	0
Increased number of mitosis of hepatocyte	total		0	0	0	0	0	0	0	1
	+		0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney										
Eosinophilic body	total	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
	±		1	8*	6	5	0	0	0	0
	+		1	7	6	0	0	0	0	0
	++		0	1	0	3	0	0	0	0
Atrophic/regenerated tubules in cortex	total		12	10	10	7	8	10	7	4
	±		11	10	10	6	8	10	7	3
	+		1	0	0	1	0	0	0	1
Vacuolar degeneration of tubular epithelium	total		0	0	0	0	0	3	11**	8**
	±		0	0	0	0	0	3	4	4
	+		0	0	0	0	0	0	3	3
	++		0	0	0	0	0	0	4	1
Focal dilatation of tubular lumen in medulla	total		0	0	0	0	1	0	0	3
	±		0	0	0	0	1	0	0	3
Focal dilatation of tubular lumen in cortex	total		0	0	1	0	0	0	0	0
	±		0	0	1	0	0	0	0	0
Calcification of cortico-medullary junction	total		1	0	0	0	1	0	0	2
	±		1	0	0	0	1	0	0	2
Infiltration of lymphocytes in interstitium	total		2	1	0	0	1	0	2	0
	±		2	1	0	0	1	0	2	0

±:very slight;+, slight;++, moderate;+++, severe

*:Significant difference from control, p<0.05

**:Significant difference from control, p<0.01

Table 10 (Continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex: Findings, grade and number of animals	male				female			
		Dose (mg/kg): 0	25	100	400	0	25	100	400
Kidney									
Hyaline cast in medulla	total	2	0	0	0	0	0	0	0
	±	2	0	0	0	0	0	0	0
Focal hyperplasia of transitional epithelium in renal pelvis	total	0	1	0	0	0	0	0	0
	+	0	1	0	0	0	0	0	0
Dilatation of renal pelvis	total	4	1	1	0	0	0	0	0
	+	4	1	1	0	0	0	0	0
Focal fibrosis in cortex	total	0	0	0	0	1	1	2	0
	±	0	0	0	0	1	1	2	0
Thymus									
Atrophy	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
	±	0			0	3	3	6	6
	+	0			0	3	1	1	1
	++	0			0	0	1	3	3
	+++	0			0	0	1	1	2
Spleen									
Decrease of blood content in red pulp	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
	±	0			0	0	2	2	3
	+	0			0	0	2	2	2
Atrophy of follicle	total	0			0	0	0	0	1
	+	0			0	0	0	0	1
Extramedullary hematopoiesis	total	13			13	13	13	12	12
	±	13			12	1	2	5	5
	+	0			1	9	7	6	6
	++	0			0	3	4	1	1
Deposits of pigment	total	13			13	13	13	13	13
	±	12			13	0	1	3	0
	+	1			0	13	10	10	8
	++	0			0	0	2	0	5
Lung									
Aggregation of foamy cells in alveolus	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
	±	9			2*	10			7
	+	7			2	8			7
Alveolitis with infiltration of macrophages/neutrophils /lymphocytes	total	3			0	0			0
	+	3			0	0			0
Calcification in artery	total	4			2	1			1
	±	4			2	1			1
Heart									
Focal necrosis of myocardial fiber	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
	±	4			1	1			3
Adrenal gland	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
	Necrosis of fascicular and reticular zone	0			0	0			1
	+++	0			0	0			1

±: very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

*: Significant difference from control, p<0.05

**: Significant difference from control, p<0.01

Table 10 (Continued)

Organ [Number of animals examined] Findings, grade and number of animals	Sex: Dose (mg/kg):	male				female			
		0	25	100	400	0	25	100	400
Thyroid gland		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Ectopic thymus	total	0			0	1			0
	+	0			0	1			0
Urinary bladder		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Diffuse hyperplasia of epithelium	total	1			2	0			0
	±	1			2	0			0
Testis		[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Focal atrophy of seminiferous tubules	total	0			1				
	++	0			1				
Decreased number of germ cells of seminiferous tubules	total	0			1				
	++	0			1				
Diffuse hyperplasia of Leydig cells	total	0			1				
	±	0			1				
Epididymis		[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Spermatic granuloma	total	1			0				
	+	1			0				
Necrotic/degenerated germ cells in lumen	total	0			1				
	+	0			1				
Infiltration of lymphocytes in interstitium	total	1			3				
	±	1			3				

±: very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

*: Significant difference from control, p<0.05

**: Significant difference from control, p<0.01

(肝臓)

400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例を含む5例に小葉中心性の肝細胞壊死がみられ、そのうちの瀕死屠殺例を除く4例では、壊死組織周囲にマクロファージが浸潤しており、瀕死屠殺例を含む2例では好中球の浸潤がみられた。400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例を含む3例に出血がみられた。また、小葉中心部では全例に肝細胞の肥大が認められ、瀕死屠殺例を含む4例に肝細胞細胞質の均質化または小空胞化が認められた。また、小葉中心部にもマクロファージの浸潤がみられた。100 mg/kg 投与群の小葉中心部でも11例に肝細胞の肥大が認められ、そのうち3例に肝細胞の壊死が、1例に軽度な肝細胞の均質化または小空胞化、5例にマクロファージの浸潤がみられた。小葉中心性の肝細胞の脂肪化が、対照群に5例、25 mg/kg 投与群に6例、100 mg/kg 投与群に9例、400 mg/kg 投与群に12例みられた。肝臓に小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化が観察された例のうちの2例および対照群1例についてOil red O染色を行った。その結果、小空胞化した肝細胞は瀕死屠殺した1例では小空胞とともに染色性を示す顆粒が認められたが、他の3例では染色性を示す顆粒はほとんど認められなかった。その他、小肉芽腫および小葉周辺性の脂肪化が認められたが、対照群とチオフェン各投与群との間に頻度および程度の差は認められなかった。

(腎臓)

チオフェン各投与群に尿細管上皮細胞の空胞変性が認められ、100および400 mg/kg 投与群では頻度および程度が増強した。対照群の1例および尿細管上皮細胞の空胞変性が観察された雌の例のうち1例についてOil red O染色を行った。その結果、空胞変性した尿細管上皮細胞は、まったく染色性を示さなかった。このほか、すべての投与群に萎縮または再生性の尿細管がみられたが、その頻度および程度に対照群とチオフェン各投与群との間で差はなかった。また、対照群の1例および400 mg/kg 投与群の3例に髄質の尿細管の拡張、対照群および25 mg/kg 投与群の各1例、および100 mg/kg 投与群の2例に皮質の限局性の線維化、対照群の1例および100 mg/kg 投与群の2例にごく軽度な間質へのリンパ球の浸潤、対照群の1例および400 mg/kg 投与群の2例に皮髄境界部のごく軽度なカルシウム沈着が認められた。

(胸腺)

対照群の3例にごく軽度な萎縮がみられた。25 mg/kg 投与群ではその程度が、また、100および400 mg/kg 投与群では頻度および程度が増強したが、対照群との間には、頻度および程度ともに差は認められなかった。

(脾臓)

25および100 mg/kg 投与群の各2例、ならびに瀕死屠殺例を含む、400 mg/kg 投与群の3例にごく軽度な赤脾

髄での血液量の減少がみられ、そのうち、瀕死屠殺例では濾胞の萎縮を伴っていた。また、色素沈着は全例でみられたが、25 mg/kg投与群の2例および400 mg/kg投与群の5例では程度が強かった。その他、髄外造血は各群のほぼ全例でみられ、程度および頻度についても対照群とチオフェン各投与群との間に差は認められなかった。

(肺)

対照群の10例および400 mg/kg投与群の7例に肺胞内の泡沫細胞の集簇が、また、対照群および400 mg/kg投与群の各1例の動脈壁にごく軽度なカルシウム沈着がみられた。

(心臓)

対照群の1例および400 mg/kg投与群の3例に限局性のごく軽度な心筋壊死がみられた。

(副腎)

400 mg/kg投与群の1例に束状帯および網状帯の広範な壊死がみられた。

(甲状腺)

対照群の1例に異所性の胸腺組織がみられた。

(胸腺、副腎、脊髄、不妊および交尾不成立雌の卵巣)

変化はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖学的検査所見

1) 交配成績 (Table 11)

交尾率および同居開始から交尾までに要した日数ならびにその間に回帰した発情期の回数に対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。また、着床の有無を基準に妊娠の成否を判定する限りにおいては、受胎した雌の数に群間で著しい差はみられず、したがって受胎率にも対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 分娩および哺育状態

観察が可能であった動物については、分娩状態の異常は観察されなかった。また、妊娠期間にも対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。なお、100 mg/kg投与群の1例は、陰栓が確認され、交尾成立が確認されてから、20日後に分娩した。しかし、出生児の体重および外表から判断された成熟度は交尾成立後22日に分娩した動物の出生児と差はなく、また、腔内に陰栓が確認された2日前に、精子は確認されなかったが、陰栓の落下が認められていたことから、この動物は交尾成立日が特定されなかったと判断して、妊娠期間ならびに妊娠期の体重および摂餌量を評価の対象から除外した。哺育状態については、児集めや児の保温を行わず、このため乳頭の突出が不良であった動物が、100 mg/kg投与群に2例、400 mg/kg投与群に1例観察された。さらに、400 mg/kg投与群では、これらの哺育行動は認められるものの、乳頭の突出が不良であった動物が1例認められた。

3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 12)

妊娠動物の黄体数、着床数および着床率に対照群とチオフェン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 12)

出産率および妊娠期間に対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。

2. 出生児所見

1) 一般状態および生存性 (Table 12)

対照群の出生児に一般状態の異常は観察されず、全出生児の死亡した腹もなかった。25 mg/kg投与群では、分娩時に母動物の下腹部に被毛汚染の観察された1腹において、哺育0日に出生児の腹部に乳汁の貯留(ミルクスポット)が観察されず、哺育1日に全例が死亡した。100 mg/kg投与群では、哺育0日から、母動物の哺育不良に起因する体表温の低下や、ミルクスポットの認められない出生児が2腹に観察され、このうち1腹の出生児は、哺育2日までに全例が死亡した。他の1腹の出生児は、哺育1日には異常は観察されなくなった。400 mg/kg投与群では、哺育1日から母動物の哺育不良に起因する、出生児の体表温の低下や、ミルクスポットの無形成が1腹の出生児に観察され、哺育4日までに全例が死亡した。また、2腹の出生児は、哺育0日に異常は観察されなかったが、1腹は哺育2日から、また、他の1腹は哺育4日に、それぞれ全例の出生児の腹部にミルクスポットが認められなくなり、1腹は哺育4日までに全出生児が死亡した。なお、これら400 mg/kg投与群の3腹の母動物には、ふらつき歩行や、振戦などが観察された。

児の生存率については、100 mg/kg以下の投与群ではいずれの時期も対照群と同様であった。400 mg/kg投与群では、分娩率、生児出産率および出生率などの出生日の生存性には投与の影響は認められなかったが、生後の死亡がやや増加し、新生児の4日の生存率が低値の傾向を示した。しかし、対照群との間に有意差は認められなかった。

性比については対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 体重 (Table 12)

100 mg/kg以下の投与群については、対照群との間に有意差は認められなかった。400 mg/kg投与群では、哺育0および4日の体重が、雌雄ともにやや低値の傾向を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 形態

哺育0日の生児についての外表観察では、いずれの動物にも異常は観察されなかった。哺育4日における出生児の剖検において、100 mg/kg投与群の1腹の雌の1例の児に、左側水腎が観察されたほかには、いずれの投与群の新生児にも異常は認められなかった。死亡児の剖検では、異常はいずれの投与群にも認められなかった。

Table 11 Summary of reproductive performance in parental rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Number of mated pairs	13	13	13	12
Number of copulated pairs	12	13	13	11
Copulation index ^{A)}	92.3	100.0	100.0	91.7
Number of pregnant animals	11	10	12	9
Fertility index ^{B)}	91.7	76.9	92.3	81.8
Pairing days until copulation (Mean ± S.D.)	2.7 ± 1.2	3.2 ± 1.6	3.0 ± 1.0	4.4 ± 3.2
Frequency of vaginal estrus (Mean ± S.D.)	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3

A) : Copulation index=(Number of copulated pairs/Number of mated pairs)×100;%

B) : Fertility index=(Number of pregnant animals/Number of copulated pairs)×100;%

Table 12 Summary of development up of pups from dams treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Number of pregnant females	11	10	12	9
Number of pregnant females with pups alive	11	10	11	9
Gestation index ^{A)}	100.0	100.0	91.7	100.0
Gestation length in days	22.2 ± 0.4 (11)	22.3 ± 0.5 (10)	22.4 ± 0.5 (10)	22.0 ± 0.0 (9)
Number of corpora lutea	14.9 ± 3.4 (11)	15.2 ± 1.7 (10)	15.0 ± 3.4 (12)	14.7 ± 1.1 (9)
Number of implantation sites	13.3 ± 3.8 (11)	13.8 ± 4.0 (10)	13.4 ± 4.9 (12)	12.9 ± 3.3 (9)
Implantation index ^{B)}	87.2 ± 15.0 (11)	89.5 ± 23.4 (10)	85.2 ± 26.5 (12)	87.1 ± 19.5 (9)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	12.6 ± 3.7 (11)	12.9 ± 3.8 (10)	12.6 ± 4.9 (12)	12.7 ± 3.3 (9)
Delivery index ^{C)}	95.5 ± 4.6 (11)	94.1 ± 8.1 (10)	86.8 ± 27.9 (12)	98.4 ± 3.3 (9)
Number of pups alive	11.9 ± 3.3 (11)	11.9 ± 4.4 (10)	12.4 ± 4.8 (12)	12.2 ± 3.1 (9)
Birth index ^{D)}	91.1 ± 10.6 (11)	87.7 ± 20.3 (10)	85.7 ± 27.4 (12)	95.3 ± 5.0 (9)
Live birth index ^{E)}	95.5 ± 10.6 (11)	92.6 ± 17.8 (10)	98.8 ± 2.6 (11)	96.9 ± 3.7 (9)
Pup weight in grams				
Male	6.6 ± 0.8 (11)	6.5 ± 0.7 (10)	6.2 ± 0.7 (11)	5.8 ± 0.6 (9)
Female	6.1 ± 0.8 (11)	6.1 ± 0.7 (10)	5.8 ± 0.8 (11)	5.5 ± 0.5 (9)
Sex ratio ^{F)}	34.6 ± 16.5 (11)	40.5 ± 13.9 (10)	50.9 ± 17.6 (11)	47.0 ± 10.7 (9)
Day 4 of lactation				
Number of pups alive	11.7 ± 3.3 (11)	11.2 ± 5.5 (10)	10.6 ± 5.6 (11)	7.4 ± 5.7 (9)
Viability index ^{G)}	98.4 ± 3.5 (11)	89.3 ± 31.5 (10)	79.6 ± 36.5 (11)	63.5 ± 43.4 (9)
Pup weight in grams				
Male	11.0 ± 1.9 (11)	10.6 ± 1.3 (10)	9.5 ± 1.8 (11)	8.5 ± 2.0 (9)
Female	10.2 ± 2.1 (11)	10.1 ± 1.5 (10)	9.0 ± 2.0 (11)	7.6 ± 2.1 (9)
Sex ratio ^{H)}	34.2 ± 17.1 (11)	42.8 ± 11.3 (9)	51.1 ± 17.6 (10)	45.6 ± 23.4 (7)

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

A) : Gestation index=(Number of pregnant females with pups alive/Number of pregnant females)×100;%

B) : Implantation index=(Number of implantation sites/Number of corpora lutea)×100;%

C) : Delivery index=(Number of pups born/Number of implantation sites)×100;%

D) : Birth index=(Number of pups alive on day 0/Number of implantation sites)×100;%

E) : Live birth index=(Number of pups alive on day 0/Number of pups born)×100;%

F) : Sex ratio=(Number of male pups alive on day 0/Number of pups alive on day 0)×100;%

G) : Viability index=(Number of pups alive on day 4/Number of pups alive on day 0)×100;%

H) : Sex ratio=(Number of male pups alive on day 4/Number of pups alive on day 4)×100;%