

既存化学物質の人健康影響に関する情報

(平成19年7月27日開催)

CASNo.	官報公示番号	物質名称	単回	28日	Reproto	簡易生殖	Ames	染色体	小核	評価文書	頁
115-70-8	2-319	2-アミノ-2-エチル-1, 3-プロパンジオール	○		○		○	○			1
298-06-6	2-1896	<i>O,O'</i> -ジエチルジチオリン酸 (別名: <i>O,O'</i> -ジエチル=ジチオホスファート)	○		○		○	○			27
542-18-7	3-2252	クロロシクロヘキサン	○		○		○	○			68
2579-20-6	3-2279	1, 3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン (別名:シクロヘキサン-1, 3-ジイルビス(メチルアミン))	○		○		○	○			254
3896-11-5	5-545	2-(2'-ヒドロキシ-3'-tert-ブチル-5'-メチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール (別名:ブメトリゾール)	○		○		○	○			451
6362-80-7	4-852	2, 4-ジフェニル-4-メチルベンゼン-1	○		○		○	○			609

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 2-Amino-2-ethyl-1,3-propanediol in Rats

要約

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールをCrj:CD(SD)IGS系雌ラットに単回経口投与し、その急性毒性を検討した。投与量は300及び2000 mg/kgとし、それ2回ずつ投与した。

死亡は、いずれの投与群にも認められず、致死量は2000 mg/kgを上回ると推定された。

一般状態、体重及び剖検では、いずれの動物にも異常はみられなかった。

方法

1. 被験物質及び被験液の調製

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオール[東京化成工業(東京)、ロット番号HDE01、純度99.4%]は微黄色透明、粘性の液体(冷暗所)である。なお、投与終了後の残余被験物質を分析した結果、使用期間中は安定であったことが確認された。

被験物質は、30及び200 mg/mLの濃度となるように注射用水(大塚製薬工場)に希釈して調製した。調製は300 mg/kgの1回目投与の3日前に行い、2000 mg/kgの2回目投与までの6日間遮光瓶に入れて冷蔵、遮光で保存した。なお、被験液は上記条件下で安定であることを確認した。また、投与に使用した被験液について濃度を確認した結果、適正であった。

2. 試験動物及び飼育条件

7週齢のCrj:CD(SD)IGS系SPFラットを日本チャーチス・リバーから購入し、7日間以上検疫・馴化飼育した後、健康な動物を選び8週齢で試験に供した。1群の動物数は1回投与当たり雌3匹とした。投与日の体重範囲は、179~211 g(平均値:190 g)、であった。

動物は、投与前日に無作為抽出法により選択した。

動物は、温度23±3°C、相対湿度50±20%，換気回数1時間当たり10~15回、照明1日12時間の飼育室で、金属製網ケージに1匹ずつ収容し、固形飼料CRF-1(オリエンタル酵母工業)及び飲料水(水道水)を自由に摂取させた。

3. 投与量及び投与方法

本被験物質のラットでの致死量に関する情報がないことから、OECD Test Guideline 423に従って、先ず300 mg/kgを投与した。その結果、死亡がみられなかった

ため、その翌日に改めて300 mg/kg投与した。300 mg/kgの2回目投与でも死亡がみられなかっただけで、更にその翌日に2000 mg/kgを投与した。2000 mg/kgでも死亡は認められず、その翌日に改めて2000 mg/kgを投与した。投与容量は10 mL/kg体重とし、約16時間絶食させた動物に胃管を用いて1回強制経口投与した。なお、投与後の給餌は投与後4時間に行い、給水は投与に関係なく継続して行った。1回投与当たり3匹を使用した。

4. 検査項目

観察期間は投与後14日とし、投与6時間後までは頻繁に、その後は1日1回、一般状態及び生死の観察を行った。体重は投与直前に測定し、これを投与液量算出の基準にした。更に、投与1, 2, 3, 7, 10及び14日後に測定した。全動物は観察期間終了後に、エーテル麻酔下で放血致死させた後、体外表、頭部、胸部及び腹部を含む全身の器官・組織の異常の有無を肉眼的に観察した。

5. 統計解析

投与量ごとの死亡動物数から概略の致死量を推定した。体重については、投与日ごとに平均体重及び標準偏差を算出した。

試験結果及び考察

1. 致死量

300及び2000 mg/kgを3匹ずつ2回に分けて計6匹に投与したが、いずれの投与群にも死亡は認められなかっただ。したがって、致死量は2000 mg/kgを上回ると推定された。

2. 一般状態

300及び2000 mg/kg投与群のいずれの動物にも異常はみられなかった。

3. 体重

300及び2000 mg/kg投与群とともに、観察期間を通して順調な体重増加が認められた。

4. 病理学検査

いずれの動物にも体外表並びに頭部、胸部及び腹部の器官・組織に異常は認められなかった。

以上のように、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの2000 mg/kgをラットに1回投与したとき死亡

単回経口投与毒性試験

は認められず、致死量は2000 mg/kgを上回ると推定された。また、一般状態、体重及び剖検所見に異常は認められなかった。

連絡先

試験責任者：西村信雄

試験担当者：勝間田豊久、野田 毅

(株)ボゾリサーチセンター御殿場研究所

〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284

Tel 0550-82-2000 Fax 0550-82-2379

Correspondence

Authors: Nobuo Nishimura (Study director)

Toyohisa Katsumata, Takeshi Noda

Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc,

1284, Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039,

Japan

Tel +81-550-82-2000 Fax +81-550-82-2379

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2-Amino-2-ethyl-1,3-propanediol by Oral Administration in Rats

要約

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの0(対照群), 250, 500及び1000 mg/kgを、Sprague-Dawley系SPFラットの雄には交配前14日間及び交配期間を通して剖検前日(42日間投与)まで、雌には交配前14日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳4日まで(42~48日間投与)投与し、反復投与毒性及び生殖発生毒性を検討した。更に、0及び1000 mg/kgについては42日間投与した後、14日間の回復期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

1. 反復投与毒性

一般状態、機能検査、握力測定、自発運動量の測定、体重、摂餌量、尿検査(摂水量を含む)、血液学検査、血液化学検査、剖検所見及び器官重量には被験物質投与による影響は認められなかった。

詳細な一般状態の観察では、オープンフィールド内観察において1000 mg/kg投与群の雄で投与3, 4, 5及び6週に立ち上がり回数の低値が認められたが、回復終了時検査には消失した。

病理組織学検査では、投与終了時検査において1000 mg/kg投与群の雄に前胃及び腺胃粘膜における細胞浸潤、腺胃の糜爛、腺胃におけるglobule leukocyte数の増加、腺胃粘膜の肥厚及び境界線の肥厚が観察された。回復終了時検査にも腺胃におけるglobule leukocyte数の増加及び境界線の肥厚は観察されたが、所見の程度は軽減し、可逆性の変化であった。

2. 生殖発生毒性

性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には被験物質投与の影響は認められなかった。また、母動物の妊娠期間、出産率、黄体数、着床痕数、着床率、分娩及び哺育行動、死産児数、死産児率、出産児数、出生率、性比、出生児の出生時観察及び生後4日剖検所見、体重及び生存性には被験物質投与の影響は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下における2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの反復投与毒性に対する無影響量は雄で500 mg/kg/day、雌で1000 mg/kg/day、生殖発生毒性に対する無影響量は雌雄親動物及び児動物ともに1000 mg/kg/dayと判断した。

方法

1. 被験物質及び被験液の調製

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオール(東京化成工業、東京、ロット番号HDE01、純度99.4%)は微黄色透明の粘性液体である。なお、投与終了後の残余被験物質を分析した結果、使用期間中は安定であったことが確認された。

被験物質は、投与容量が10 mL/kg体重となるように注射用水で希釈して25, 50及び100 mg/mL溶液を調製した。調製は最大7日分を一括して行い、1日分ずつ褐色ガラス瓶(遮光瓶)に入れて冷蔵(実測値:3~5°C)で保存した。なお、被験液は上記条件下で安定であることを確認した。また、投与1及び投与最終週の2回、投与に使用した被験液について濃度及び均一性を測定した結果、適正な濃度、均一性であった。

2. 使用動物及び飼育条件

Sprague-Dawley系SPFラット[Crj:CD(SD)IGS、日本チャールス・リバー、厚木飼育センター]の雌雄各70匹を8週齢で入手し、14日間検疫・馴化飼育した。その間、一般状態の観察、体重測定及び性周期検査(検疫期間終了後の9日間)を基に、一般状態及び性周期に異常がなく、体重増加が良好な雌雄各58匹を選択し、10週齢で投与に使用した。投与開始日の体重範囲は、雄で345~403 g、雌で206~258 gであり、いずれの動物の体重も平均値±20%以内であった。

動物は、群分け当日の体重に基づいて層別化し、各群平均体重がほぼ均等となるよう、コンピュータを用いて各群に割り付けた。

動物は、温度23±3°C、相対湿度50±20%、換気回数1時間当たり10~15回、照明1日12時間の飼育室で、金属製網ケージに1匹ずつ収容し、交配期間中は雌雄各1匹の計2匹を収容した。なお、妊娠17日から授乳4日までは、床敷(ホワイトフレーク:日本チャールス・リバー株式会社)を入れたプラスチック製エコンケージで個別に収容した。固体飼料(NMF、オリエンタル酵母工業)及び飲料水(水道水)を自由に摂取させ飼育した。

3. 投与量、群構成及び動物数

2週間投与による予備試験(投与量:125, 250, 500及び1000 mg/kg)の結果、OECD Test Guideline 422で投与限界量とされている1000 mg/kgにおいても被験物質投与の影響は認められなかった。これらの結果から、

1000 mg/kgを高用量とし、以下公比2で除して500及び250 mg/kgの3用量を設定し、これに対照群を加えた計4群(1群の動物数は雌雄各12匹)を使用した。さらに、対照群及び1000 mg/kg群では回復群(1群の動物数は雌雄各5匹)を設けた。

被験液の投与容量は10 mL/kg体重とし、胃管を用いて1日1回強制経口投与した。対照群には溶媒(注射用水)を同様に投与した。投与液量は最新の体重を基準に算出した。回復期間は14日間とした。

4. 検査項目

1) 一般状態の観察

投与期間中は毎日2回以上、回復期間中は毎日1回観察した。

(1) 詳細な一般状態の観察

投与開始前に1回、投与期間中及び回復期間中は毎週1回観察した。なお、観察及び検査は投与の情報を制限(ブラインド)し、動物をランダムに配置した状態で行った。

①ホームケージ内観察

姿勢、痙攣、異常行動

②手に持つての観察

ホームケージからの取り出し易さ、ハンドリングに対する反応(ハンドリング時の発声を含む)、被毛・皮膚の状態(被毛の汚れ、粗毛、外傷、皮膚の色など)、眼球(眼球突出、眼瞼の開き具合)、眼・鼻の分泌物、可視粘膜、自律神経機能(流涙、流涎、立毛、瞳孔径、呼吸)

③オープンフィールド内観察

歩行、姿勢、覚醒状態、振戦、痙攣、立ち上がり回数、排泄物(排糞数、排尿)、常同行動(身繕い、旋回など)、異常行動(自咬、後方突進など)

② 機能検査

雄は投与終了週に、雌は授乳4日のF₁児剖検後に、回復群の雌雄は回復終了週にそれぞれ1群当たり5匹について以下の検査をブラインドで行った。

[聴覚反応、接近反応、接触反応、痛覚反応、瞳孔反射、空中正向反射、着地開脚幅]

③ 握力測定

上記機能検査に引き続き、前肢及び後肢の握力測定(CPUゲージMODEL-9502 A、アイコーエンジニアリング)の測定をブラインドで行った。

④ 自発運動量の測定

上記握力測定に引き続き、自発運動量の測定(実験動物用自発運動センサーNS-AS01、ニューロサイエンス)をブラインドで行った。測定は1時間を行い、10分間隔及び60分間の運動量を集計した。

2) 体重測定

投与期間及び回復期間を通じ、週2回(投与第1週と回復第1週は3回)の頻度で、交尾確認雌動物は妊娠0, 4, 7, 11, 14, 17及び20日並びに授乳0及び4日に体重を測定した。

3) 摂餌量測定

投与期間及び回復期間を通じ、週2回(投与第1週は3回)の頻度で、妊娠1, 4, 7, 11, 14, 17及び20日並びに授乳2及び4日に摂餌量を測定した。

4) 膀胱スメア検査

全個体について、群分け日までの性周期観察に引き続き、交尾確認日まで毎日膀胱スメアを採取し、鏡検した。交配前投与期間中は膀胱スメア像を発情前期、発情期、発情後期及び発情休止期に分類し、発情期像発現回数及び発情期から次の発情期までの日数(性周期)を調べた。交配期間中は膀胱スメア内の精子の有無を調べた。

5) 交配

交配前投与期間終了後、主群の同投与群の雌雄を1:1で終夜同居させ、翌朝、膀胱形成あるいは膀胱スメア中に精子を確認したものを交尾成立とみなした。交尾までに要した日数は交配開始日を0日と起算した。交配成績から交尾率%[(交尾動物数/同居動物数)×100]、受胎率%[(妊娠した雌の数/交尾した雌の数)×100]、授精率%[(妊娠した雌の数/交尾した雄の数)×100]を算出した。

6) 分娩及び授乳観察

(1) 母動物の観察

交尾確認雌動物は全例自然分娩させ、分娩状態の異常の有無を観察した。分娩終了の確認は妊娠21日から妊娠22日の午後まで1日2回(午前、午後)を行い、妊娠期間を0.5日単位で算出した。分娩が午後5時に終了していた場合、その日を授乳0日とし、妊娠期間(日)(授乳0日-妊娠0日)及び出産率%[(生存児出産雌数/妊娠雌数)×100]を算出した。

分娩が終了した母動物は出生児の喰殺、胎盤及び羊膜の処理の有無を観察し、分娩終了日を授乳0日とし、授乳4日まで出生児を授乳させ、児集め、営巣及び授乳を指標として授乳状態を観察した。

母動物は授乳4日から一夜(約16~20時間)絶食させた授乳5日に、各群5匹は血液学検査及び血液化学検査のための採血後に、その他の動物はエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、黄体数及び着床痕数を数え、着床率%[(着床痕数/黄体数)×100]を算出した。

(2) 出生児の観察

出生日に生存児数、死産児数を数えた。出生児は外表異常の有無を観察し、性別を判定して体重を測定した後、母動物に授乳させた。また、死産児率%[(死産児数/総出産児数)×100]、出生率%[(生存児数/総出産児数)×100]、外表異常率%[(外表異常児数/生存児数)×100]及び性比[雄数/(雄数+雌数)]を算出した。死産児(死後変化の著しい場合は除く)はリン酸緩衝10 vol%ホルマリン液に固定し、保存した。出生児は生死の観察を授乳4日まで毎日1回を行い、出生児生存率%[(授乳4日生存児数/授乳0日生存児数)×100]を算出した。

た。授乳4日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で放血致死させて剖検を行い、頭部・胸部・腹部を含む器官・組織の異常の有無を調べた。なお、出生児の体重は個体別に体重を測定し、各腹単位で雌雄別に平均値を算出した。

7) 雄の尿検査

投与最終週(投与38～39日)及び回復終了週(回復9～10日)に雄動物を代謝ケージに個別に収容し、絶食・自由摂水下で4時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取した。採取した最初の4時間尿を用いてpH、たん白質、ケトン体、グルコース、潜血、ビリルビン、ウロビリノーゲン(以上オーションスティッククス-7EA試験紙、アークレイ)、色調(肉眼観察)及び沈渣(鏡検)を検査した。また、その後に得られた20時間尿を用いて浸透圧(冰点降下法)、自動浸透圧測定装置オートアンドスタットOM-6030、アークレイ)を測定し、4時間尿量及び20時間尿量から1日の尿量を算出した。更に、代謝ケージに収容した状態で、前日からの1日の摂水量を給水瓶を用いて測定した。

8) 血液学検査

最終投与及び回復期間終了日の翌日の剖検時に検査を行った。前日から一夜(約16時間)絶食させた動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から抗凝固剤(EDTA-2 K)を加えた採血ビンに血液を採取し、赤血球数(電気抵抗変化検出法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(平均赤血球容積及び赤血球数から算出)、平均赤血球容積(電気抵抗変化検出法)、平均赤血球血色素量(ヘモグロビン量及び赤血球数から算出)、平均赤血球血色素濃度(ヘモグロビン量及びヘマトクリット値から算出)、血小板数(電気抵抗変化検出法)、白血球数(電気抵抗変化検出法)(以上コールター全自動8項目血球アナライザT890、ベックマン・コールター)、網赤血球率(Brecher法)及び白血球百分率(May-Giemsa鏡検法)を測定した。また、3.8%クエン酸ナトリウムを加えた容器に採取した血液を遠心分離(3000回転/分、10分間)し、得られた血漿を用いてプロトロンビン時間(クロット法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(クロット法)及びフィブリノーゲン量(トロンボプラスチン法)(以上、血液凝固自動測定装置ACL 100、Instrumentation Laboratory)を測定した。

9) 血液生化学検査

血液学検査のための採血と同時に腹大動脈から採血し、遠心分離(3000回転/分、10分間)により得られた血清を用いてAlP(Bessey-Lowry法)、総コレステロール(CEH-COD-POD法)、トリグリセライド(LPL-GK-GPO-POD法)、リン脂質(PLD-ChOD-POD法)、総ビリルビン(ビリルビンオキシダーゼ法)、グルコース(グルコースデヒドロゲナーゼ法)、尿素窒素(Urease-LEDH法)、クレアチニン(Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase POD法)、ナトリウム、カリウム及び

塩素(イオン選択電極法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(モリブデン酸法)、総たん白質(Biuret法)、アルブミン(BCG法)及びA/G比(総たん白質及びアルブミンから算出)を測定した。また、ヘパリンを加えた容器に採血し、遠心分離(3000回転/分、10分間)により得られた血漿を用いてAST、ALT、LDH(UV-rate法)及び γ -GTP($L-\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニド法)(以上、臨床化学自動分析装置TBA-120FR、東芝)を測定した。

10) 剖検及び器官重量

全ての動物について、最終投与翌日及び回復期間終了日に、血液・血液化学検査のために採血した動物(各群雌雄各5匹)は採血後に、その他の動物は腹大動脈切断により放血致死させた後に、それぞれ体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。なお、雌動物(母動物)は授乳5日に黄体数及び着床痕数を数えた。次いで、血液学検査及び血液化学検査の採血を行った各群雌雄各5匹について、以下に示す器官(精巣及び精巣上体は全例)の重量(絶対重量)を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重100 g当たりの相対重量を算出した。なお、*印をつけた両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

[脳、甲状腺*(上皮小体を含む)、胸腺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓*、副腎*、精巣*及び精巣上体*]

11) 病理組織学検査

全動物について、以下に示す全器官・組織を採取し、リン酸緩衝10vol%ホルマリン液で固定、保存した(但し、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後リン酸緩衝10vol%ホルマリン液で保存)。次いで、下線を施した器官・組織についてパラフィン包埋した後、切片としてヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を行い、このうち対照群及び高用量群の血液・血液化学検査に供した雌雄各5匹について鏡検した(両側性の器官については両側を摘出し、片側を鏡検)。その結果、胃に被験物質投与の影響が認められたため、低及び中用量群並びに回復群についても雌雄各5匹を鏡検し、正常及び異常所見の代表例を撮影した。

[大脳、小脳、下垂体、脊髄(胸部)、坐骨神経、甲状腺、上皮小体、副腎、胸腺、脾臓、頸下リンパ節、腸間膜リンパ節、心臓、肺(気管支を含む)、腎、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、精囊、胸骨(骨髓を含む)、大腿骨(骨髓を含む)、個体識別部(耳介)]

5. 統計解析

交尾率、受胎率、授精率、出産率、出生児の性比、聴覚反応、接近反応、接触反応、痛覚反応、瞳孔反射、空中正向反射は、イエーツの連続修正による χ^2 検定を行った(有意水準0.05及び0.01、両側)。ただし、期待度数が5以下のセルがみられる場合にはFisherの直接確率計算

法により検定を行った(有意水準0.05及び0.01、両側)。着床率、死産児率、出生率、外表異常率、出生児生存率は動物ごとに率を求めた後、Bartlett検定により等分散性を検定し、等分散の場合はDunnett検定、非等分散の場合はDunnett型検定を行った(有意水準0.05及び0.01、両側)。その他の数値化した成績についてまずBartlett法により各群の分散の均一性の検定(有意水準:両側1%)を行った。その結果、分散が均一の場合にはDunnett法を用いて対照群と各投与群との平均値の差の検定を、分散が均一でない場合には、Dunnett型の方法(mean rank test法)を用いて対照群と各投与群との平均順位の差の検定を行った(有意水準:いずれも両側5及び1%)。また、尿の定性的項目及び病理組織学検査の成績についてはMann-WhitneyのU検定(有意水準:片側5及び1%)を行った。

結果

1. 一般状態

いずれの動物においても、投与期間及び回復期間を通じ異常はみられなかった。

詳細な一般状態の観察、機能検査、握力測定及び自発運動量の測定においては、1000 mg/kg投与群の雄で投与3, 4, 5及び6週にオープンフィールド内の立ち上がり回数に有意な低値が認められた。その他、500 mg/kg投与群の雌で授乳4日の握力測定に有意な高値、1000 mg/kg投与群の雌でオープンフィールド内の投与5週に立ち上がり回数の有意な高値、測定開始20~30分の自発運動量に有意な高値が認められたが、用量との関連はない、または一時的であることから、変動範囲内の変化

と考えられた。その他の検査項目では、いずれの動物にも異常はみられなかった。

2. 体重(主群、Fig. 1, 2)

各群の雌雄体重ともに対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

3. 摂餌量

各群の雌雄摂餌量とともに被験物質投与による影響は認められなかった。なお、主群においては250 mg/kg投与群の雄で投与42日に有意な低値、1000 mg/kg投与群の雌で妊娠4日に有意な高値、回復群においては1000 mg/kg投与群の雌で投与25及び29日に有意な高値、同群の雌では回復11日に有意な高値が認められたが、いずれも一時的であることから変動範囲内の変化と判断した。

4. 血液学検査(Table 1)

1) 投与期間終了時検査

1000 mg/kg投与群の雄では、好酸球の有意な低値が認められたが、高値でないことから毒性学的に意義はない。また、500 mg/kg投与群の雌では、リンパ球比率の有意な高値及び分葉好中球比率の有意な低値が認められたが、用量との関連がないことから、生理的変動範囲内の変化と考えられた。

2) 回復期間終了時検査

1000 mg/kg投与群の雄では、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値に有意な低値が認められたが、投与期間終了時にみられない変化であり、かつ投与

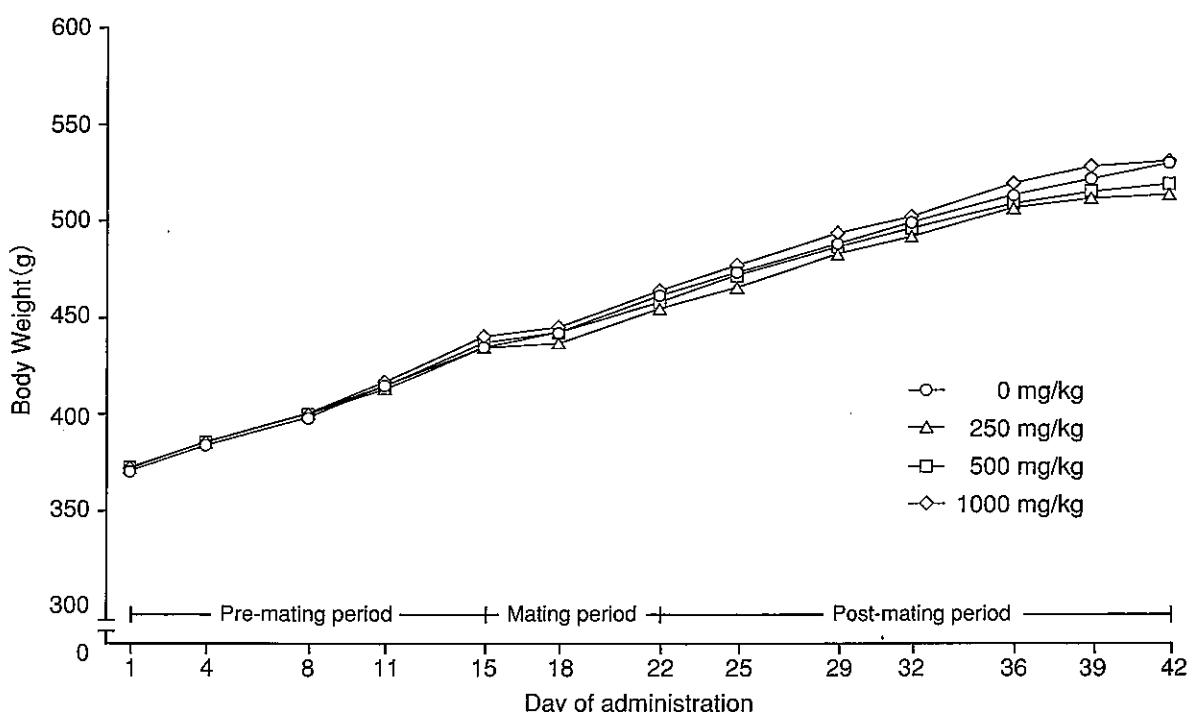


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

期間終了時と同等値であることから、生理的変動範囲内の変化と判断した。同群の雌では、網状赤血球率に有意な低値が認められたが、軽微な変化であり、他の検査項目に有意差がみられないことから、生理的変動範囲内の変化と考えられた。

5. 血液化学検査(Table 2)

1) 投与期間終了時検査

250 mg/kg以上の投与群の雄ではA/G比の有意な高値、1000 mg/kg投与群の雄でトリグリセライド及び尿素窒素に有意な高値、塩素の有意な低値、同群の雌では γ -GTPの有意な低値が認められた。

2) 回復期間終了時検査

1000 mg/kg投与群の雌雄ともにいずれの検査項目にも有意差は認められなかった。

6. 雄の尿検査(Table 3)

定量項目については、いずれの検査項目においても対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。定性項目については、主群及び回復群のいずれの動物にも異常はみられなかった。

7. 器官重量(Table 4)

1) 投与期間終了時剖検例

絶対及び相対重量の双方に同一方向に有意差が認められた器官・組織はなかった。なお、以下の変化がみられた。500 mg/kg投与群の雌で脾臓の相対重量に有意な高値、500及び1000 mg/kg投与群の雌で腎臓の絶対重量に有意な高値が認められたが、用量との関連はなかった。

2) 回復期間終了時剖検例

1000 mg/kg投与群の雌で甲状腺の絶対重量に有意な高値が認められた。

8. 剖検所見

1) 投与期間終了時剖検例

腺胃の暗赤色巣が500 mg/kg投与群の雌2例、精巣の小型化が250 mg/kg投与群の雄1例にみられたが、出現頻度及び病理学的性状から偶発的変化と判断した。

2) 回復期間終了時剖検例

いずれの器官・組織においても、異常はみられなかつた。

9. 病理組織学検査(Table 5)

被験物質投与の影響が1000 mg/kg投与群の雄の胃にみられた。

1) 投与期間終了時剖検例

軽微又は軽度な前胃及び腺胃粘膜における細胞浸潤が1000 mg/kg投与群の雄3例、軽微又は軽度な腺胃の糜爛が250 mg/kg投与群の雌2例、500 mg/kg投与群の雌2例及び1000 mg/kg投与群の雄3例と雌1例、腺胃における軽微又は軽度なglobule leukocyte¹⁾数の増加が対照群の雄1例、500 mg/kg投与群の雄2例及び1000 mg/kg投与群の雄4例と雌1例、軽微又は軽度な腺胃粘膜の肥厚が1000 mg/kg投与群の雄3例、軽微又は軽度な境界縁の肥厚が対照群の雄1例、500 mg/kg投与群の雄2例及び1000 mg/kg投与群の雄5例にみられた。これら変化のうち、腺胃粘膜における細胞浸潤、腺胃の糜爛、腺胃におけるglobule leukocyte数の増加及び境界縁の肥厚の

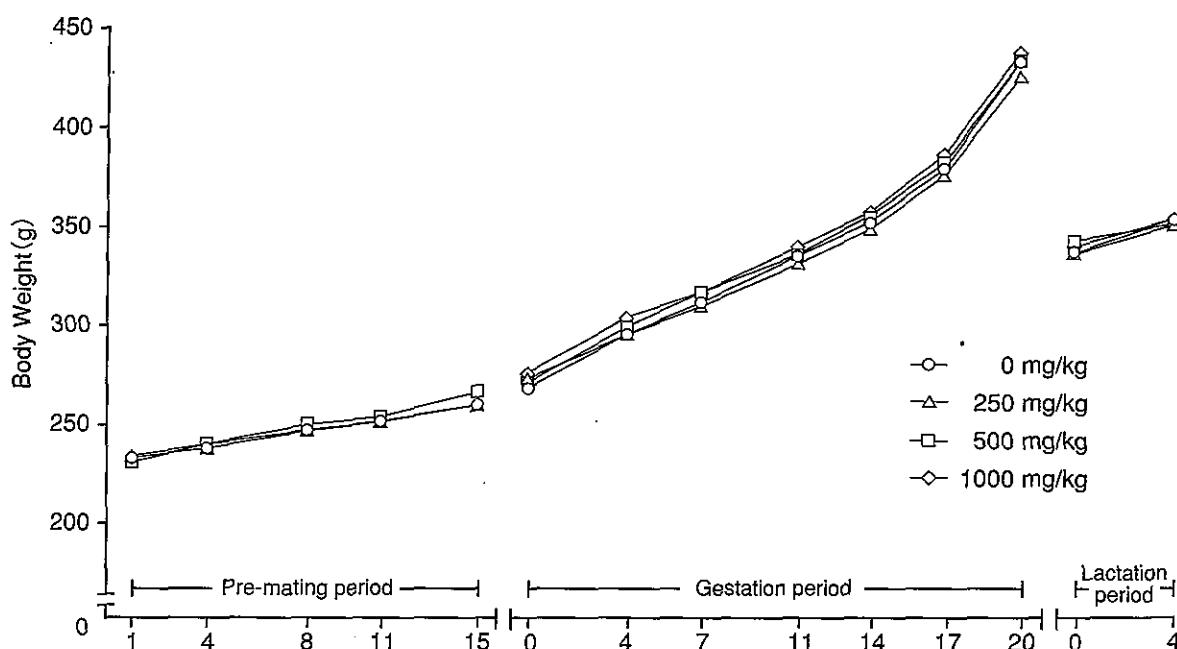


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

出現頻度が1000 mg/kg投与群の雄で増加し、所見の程度が増強した。

上記以外の所見は正常ラットでもしばしば認められること、あるいはその出現状況からいずれも偶発所見と判断した。

2) 回復期間終了時剖検例

軽微な腺胃の糜爛が対照群の雌1例、腺胃における軽微なglobule leukocyte数の増加が1000 mg/kg投与群の雄3例と雌1例、軽微な境界線の肥厚が1000 mg/kg投与群の雄5例にみられ、対照群と比べ腺胃におけるglobule leukocyte数の増加及び境界線の肥厚の出現頻度が1000 mg/kg投与群の雄で増加した。

10. 性周期(Table 6)

性周期異常の動物はみられず、平均性周期日数には対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

11. 交配成績(Table 6)

対照群の1組が交配開始7日に、他の組み合わせは交配開始後4日までに交尾が成立し、雌全例が妊娠した。したがって、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

12. 分娩成績及び分娩・授乳状態(Table 7)

分娩状態では、妊娠21.5～22.5日に全例が正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出産児数及び出生率には対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。哺育状態では、いずれの母動物にも巣作り、児集め及び授乳行動に異常はみられなかった。

13. 出生児の観察(Table 7)

性比の有意な低値が500 mg/kg投与群に、出生時の雄体重の有意な高値が250 mg/kg投与群に認められたが、いずれも用量との関連はなかった。外表異常を有する出生児として、痕跡尾が1000 mg/kg投与群に1例みられたが、出現頻度及び外表異常の種類から自然発生によるものと考えられた。

14. 出生児の生存率(Table 7)

哺育4日生存率には対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

15. 出生児の体重(Table 7)

出生時の雄体重に有意な高値が250 mg/kg投与群に認められたが、用量との関連はなかった。哺育4日の体重には対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

16. 出生児の授乳4日剖検所見

いずれの出生児にも異常はみられなかった。

考察

1. 反復投与毒性

一般状態、機能検査、握力測定、自発運動量の測定、体重、摂餌量、尿検査(摂水量を含む)、血液学検査、剖検所見及び器官重量の結果に被験物質投与による影響は認められなかった。

詳細な一般状態の観察では、オープンフィールド内観察において1000 mg/kg投与群の雄で投与3, 4, 5及び6週に立ち上がり回数の低値が認められた。しかし、他の検査項目、特に自発運動量に異常はなく、回復終了時検査にも認められないことから可逆性の変化であった。

血液化学検査では、投与期間終了時検査において250 mg/kg以上の投与群の雄でA/G比の高値、1000 mg/kg投与群の雄でトリグリセライドの高値、尿素窒素の高値、塩素の低値、同群の雌ではγ-GTPの高値が認められたが、軽微な変化で関連検査項目に変動がなく、組織学的にも異常がないことから生理学的な変動範囲内の変化と判断した。

病理組織学検査では、投与終了時検査において1000 mg/kg投与群の雄に腺胃粘膜における細胞浸潤、腺胃の糜爛、腺胃におけるglobule leukocyte数の増加、腺胃粘膜の肥厚及び境界線の肥厚が観察され、被験物質の胃への刺激性が示唆された。これら胃の変化のうち、腺胃におけるglobule leukocyte数の増加及び境界線の肥厚が回復終了時検査においても観察されたが、所見の程度は軽減し、可逆性の変化であった。

2. 生殖発生毒性

性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には被験物質投与の影響は認められなかった。また、母動物の出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児数、死産児率、出産児数、出生率及び性比に被験物質投与の影響は認められず、授乳期間中の授乳状態に異常は認められないことから、1000 mg/kg投与群においても雌雄動物の交尾能、授精能及び受胎能、母動物の妊娠維持、分娩及び哺育行動などの生殖機能への影響はないと考えられた。

出生児では、出生時の観察及び授乳4日剖検所見、体重及び生存率には被験物質投与群による変化は認められないことから、1000 mg/kg投与群においても胚・胎児の成長と形態学的変化、生後の成長・発達への影響はないと考えられた。

これらの結果から、本試験条件下における2-アミノ-2-エチル-1, 3-プロパンジオールの反復投与毒性に対する無影響量は雄で500 mg/kg/day、雌で1000 mg/kg/day、生殖発生毒性に対する無影響量は雌雄動物及び児動物ともに1000 mg/kg/dayと判断した。

文献

- 1) Isao Narama, Kiyokazu Ozaki, Syuuichi Matsushima and Tetsuro Matsuura: Eosinophilic Gastroenterocolitis in Iron Lactate-Overloaded Rats, Toxicologic Pathology, 27(3):318-324 (1999).

連絡先

試験責任者：石田 茂

試験担当者：下山泰史，畠山和久，楠岡 修，

野田 翼，勝亦俱慶

(株)ボゾリサーチセンター御殿場研究所

〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284

Tel. 0550-82-2000 Fax. 0550-82-2379

Correspondence

Authors: Shigeru Ishida (Study director)

Yasushi Shimoyama,

Kazuhisa Hatayama,

Osamu Kusuoka, Tsuyoshi Noda,

Toyohisa Katsumata

Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.

1284, Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039,

Japan

Tel +81-550-82-2000 Fax +81-550-82-2379

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 1 Hematological examination in rats treated orally with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	Week 6 of administration (mg/kg)				Day 14 of recovery (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC($10^6/\mu\text{L}$)	826 ± 25	847 ± 40	839 ± 25	807 ± 24	875 ± 31	830 ± 24*
Hb(g/dL)	15.6 ± 0.5	16.0 ± 0.5	15.6 ± 0.9	14.9 ± 0.7	16.2 ± 0.4	15.3 ± 0.4*
Ht(%)	45 ± 2	47 ± 2	45 ± 3	43 ± 2	47 ± 2	44 ± 1*
MCV(fL)	54.9 ± 0.7	55.0 ± 1.4	54.0 ± 2.2	53.8 ± 1.2	53.6 ± 1.3	53.3 ± 0.9
MCH(pg)	18.9 ± 0.5	18.8 ± 0.4	18.6 ± 0.7	18.5 ± 0.5	18.5 ± 0.4	18.5 ± 0.4
MCHC(%)	34.4 ± 0.7	34.2 ± 0.6	34.4 ± 0.4	34.4 ± 0.5	34.5 ± 0.4	34.6 ± 0.3
Reticulocyte(%)	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.4	2.4 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.4
Platelet($10^6/\mu\text{L}$)	103.5 ± 7.2	103.8 ± 9.2	113.1 ± 12.8	115.8 ± 10.3	101.9 ± 13.0	114.2 ± 12.1
WBC($10^6/\mu\text{L}$)	83 ± 12	86 ± 13	91 ± 23	106 ± 17	107 ± 28	105 ± 22
Differential leukocyte counts(%)						
Lymph	85.9 ± 5.2	86.4 ± 5.1	85.6 ± 5.3	83.4 ± 6.9	86.9 ± 4.3	85.6 ± 3.8
Stab	0.4 ± 0.4	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.2
Seg	11.9 ± 5.8	12.7 ± 4.6	13.4 ± 4.7	15.8 ± 6.7	11.5 ± 4.5	12.5 ± 4.3
Eosino	1.3 ± 1.0	0.7 ± 0.6	0.7 ± 0.6	0.2 ± 0.3*	0.9 ± 1.0	1.2 ± 1.0
Baso	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Mono	0.5 ± 0.5	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.4
Others	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PT(S)	12.9 ± 0.8	12.9 ± 0.2	13.1 ± 0.7	12.3 ± 0.3	13.7 ± 0.2	13.2 ± 0.8
APTT(S)	17.5 ± 1.5	18.9 ± 0.9	18.6 ± 0.7	17.9 ± 0.6	19.5 ± 1.4	17.5 ± 2.0
Fibrinogen(mg/dL)	325 ± 14	319 ± 14	306 ± 19	336 ± 51	293 ± 30	305 ± 48
Item	Day 4 of lactation (mg/kg)				Day 14 of recovery (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC($10^6/\mu\text{L}$)	694 ± 10	689 ± 65	717 ± 31	673 ± 31	800 ± 27	817 ± 25
Hb(g/dL)	14.1 ± 0.4	13.8 ± 0.8	14.4 ± 0.4	13.7 ± 0.6	15.6 ± 0.8	15.8 ± 0.6
Ht(%)	41 ± 2	40 ± 2	42 ± 1	40 ± 2	45 ± 3	46 ± 2
MCV(fL)	58.7 ± 1.4	58.6 ± 2.4	58.0 ± 2.1	59.6 ± 0.9	56.2 ± 2.7	56.1 ± 0.9
MCH(pg)	20.4 ± 0.4	20.1 ± 0.9	20.0 ± 0.6	20.4 ± 0.3	19.5 ± 0.8	19.4 ± 0.4
MCHC(%)	34.8 ± 0.7	34.3 ± 0.4	34.6 ± 0.5	34.2 ± 0.3	34.7 ± 0.5	34.6 ± 0.4
Reticulocyte(%)	4.7 ± 1.4	4.9 ± 2.3	3.9 ± 0.7	5.1 ± 1.2	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.1*
Platelet($10^6/\mu\text{L}$)	126.4 ± 8.9	140.9 ± 19.8	128.3 ± 9.3	125.0 ± 15.5	104.7 ± 11.7	112.2 ± 5.2
WBC($10^6/\mu\text{L}$)	100 ± 34	98 ± 26	130 ± 25	132 ± 41	55 ± 7	52 ± 11
Differential leukocyte counts(%)						
Lymph	68.9 ± 8.2	78.1 ± 7.4	80.6 ± 4.3*	71.8 ± 3.4	81.4 ± 8.3	83.3 ± 5.2
Stab	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.3	0.5 ± 0.6	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.4
Seg	30.1 ± 8.4	20.7 ± 7.6	18.3 ± 4.9*	26.7 ± 3.4	16.8 ± 7.6	14.3 ± 4.5
Eosino	0.7 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.2 ± 0.3	0.5 ± 0.5	1.2 ± 1.4	1.7 ± 0.8
Baso	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Mono	0.3 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.4
Others	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PT(S)	12.6 ± 0.3	12.6 ± 0.3	13.0 ± 0.3	12.5 ± 0.6	12.2 ± 0.3	12.3 ± 0.2
APTT(S)	17.6 ± 3.0	16.1 ± 0.5	16.1 ± 1.3	15.0 ± 1.4	15.3 ± 1.9	15.2 ± 1.8
Fibrinogen(mg/dL)	362 ± 43	334 ± 83	359 ± 78	382 ± 70	231 ± 26	224 ± 25

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *p<0.05

Table 2 Blood chemical examination in rats treated orally with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	Week 6 of administration (mg/kg)				Day 14 of recovery (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
AST(IU/L)	80 ± 10	78 ± 10	75 ± 9	73 ± 9	69 ± 6	77 ± 10
ALT(IU/L)	36 ± 8	35 ± 6	35 ± 4	31 ± 2	32 ± 5	33 ± 6
LDH(IU/L)	50 ± 11	47 ± 5	54 ± 16	50 ± 12	43 ± 10	50 ± 12
γ-GTP(IU/L)	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1
AIP(IU/L)	415 ± 74	470 ± 85	514 ± 31	428 ± 57	354 ± 88	382 ± 84
TP(g/dL)	6.4 ± 0.1	6.3 ± 0.2	6.1 ± 0.3	6.2 ± 0.4	6.0 ± 0.5	6.0 ± 0.3
Albumin(g/dL)	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.2	2.7 ± 0.2	2.7 ± 0.2
A/G	0.73 ± 0.03	0.80 ± 0.03*	0.80 ± 0.05*	0.80 ± 0.03**	0.82 ± 0.02	0.81 ± 0.03
T. cho(mg/dL)	54 ± 16	50 ± 9	49 ± 8	55 ± 12	44 ± 8	50 ± 12
TG(mg/dL)	21 ± 13	32 ± 12	30 ± 9	49 ± 27*	26 ± 7	40 ± 16
PL(mg/dL)	84 ± 24	84 ± 12	81 ± 4	90 ± 14	74 ± 11	85 ± 16
T. bilirubin(mg/dL)	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
Glucose(mg/dL)	147 ± 22	149 ± 21	154 ± 29	156 ± 12	149 ± 17	148 ± 19
BUN(mg/dL)	15 ± 2	15 ± 2	17 ± 1	18 ± 1*	16 ± 2	15 ± 2
Creatinine(mg/dL)	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.05
Na(mmol/L)	146 ± 1	145 ± 1	144 ± 2	144 ± 1	144 ± 2	144 ± 1
K(mmol/L)	4.8 ± 0.2	4.7 ± 0.2	5.0 ± 0.1	4.6 ± 0.3	4.5 ± 0.4	4.6 ± 0.1
Cl(mmol/L)	108 ± 1	108 ± 2	108 ± 2	105 ± 1*	107 ± 2	105 ± 1
Ca(mg/dL)	9.7 ± 0.1	9.8 ± 0.1	9.7 ± 0.2	9.9 ± 0.4	9.6 ± 0.3	9.8 ± 0.2
P(mg/dL)	6.9 ± 0.3	6.9 ± 0.4	7.3 ± 0.4	7.2 ± 0.5	6.9 ± 0.5	7.1 ± 0.4
Item	Day 4 of lactation (mg/kg)				Day 14 of recovery (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
AST(IU/L)	83 ± 12	80 ± 5	87 ± 26	85 ± 13	160 ± 169	106 ± 36
ALT(IU/L)	54 ± 6	48 ± 5	47 ± 13	51 ± 10	71 ± 55	58 ± 18
LDH(IU/L)	57 ± 10	73 ± 24	47 ± 12	59 ± 11	105 ± 121	70 ± 30
γ-GTP(IU/L)	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1*	2 ± 1	1 ± 0
AIP(IU/L)	320 ± 148	359 ± 168	335 ± 114	357 ± 101	218 ± 70	182 ± 43
TP(g/dL)	6.6 ± 0.3	6.5 ± 0.2	6.3 ± 0.3	6.4 ± 0.2	6.7 ± 0.4	6.9 ± 0.3
Albumin(g/dL)	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1
A/G	0.83 ± 0.04	0.82 ± 0.04	0.80 ± 0.02	0.81 ± 0.03	0.83 ± 0.03	0.83 ± 0.03
T. cho(mg/dL)	60 ± 10	57 ± 19	52 ± 2	63 ± 12	77 ± 19	63 ± 11
TG(mg/dL)	34 ± 34	44 ± 29	31 ± 17	31 ± 5	12 ± 4	10 ± 3
PL(mg/dL)	113 ± 7	111 ± 32	104 ± 13	121 ± 16	134 ± 23	120 ± 17
T. bilirubin(mg/dL)	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0
Glucose(mg/dL)	144 ± 16	135 ± 11	127 ± 8	132 ± 4	142 ± 12	136 ± 15
BUN(mg/dL)	18 ± 3	17 ± 2	18 ± 4	20 ± 2	18 ± 5	19 ± 2
Creatinine(mg/dL)	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.34 ± 0.03
Na(mmol/L)	143 ± 1	142 ± 2	141 ± 1	141 ± 1	142 ± 1	142 ± 0
K(mmol/L)	4.8 ± 0.3	4.9 ± 0.4	4.8 ± 0.4	4.8 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.3
Cl(mmol/L)	110 ± 1	108 ± 2	109 ± 1	108 ± 2	111 ± 1	110 ± 1
Ca(mg/dL)	9.9 ± 0.2	10.2 ± 0.6	10.0 ± 0.3	10.3 ± 0.3	9.7 ± 0.2	9.9 ± 0.2
P(mg/dL)	7.5 ± 0.6	7.6 ± 1.5	8.1 ± 0.6	8.2 ± 1.0	5.4 ± 0.9	5.7 ± 0.5

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *p<0.05 **p<0.01

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 3 Urinalysis of male rats treated orally with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	Week 6 of administration (mg/kg)				Week 2 of recovery (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Male						
Number of animals	17	12	12	17	5	5
Volume (mL/24 hr)	20.6 ± 6.3	18.3 ± 3.4	17.4 ± 5.1	20.7 ± 3.7	13.4 ± 7.4	10.8 ± 4.3
Osmolality (mOsm/kg)	1923 ± 368	2090 ± 153	2106 ± 241	2035 ± 230	1854 ± 644	1877 ± 358
Water intake (mL/24 hr)	51 ± 14	44 ± 7	45 ± 8	49 ± 8	48 ± 18	52 ± 9
pH	6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0	1 0 5 10 1 0	0 0 0 0 7 5	0 0 0 0 9 8	0 0 1 1 3 0	0 0 2 2 1 0
Protein	- -/+ 1+ 2+	3 13 1 0	1 8 3 0	0 4 7 1	0 2 3 0	1 3 1 0
Ketone body	- -/+ 1+	15 2 0	10 1 1	5 6 1	6 9 2	2 0 3
Glucose	-	17	12	12	17	5
Occult blood	- -/+ 1+ 2+	13 2 1 1	10 1 1 0	11 0 0 1	16 0 1 0	4 1 0 0
Bilirubin	-	17	12	12	17	5
Urobilinogen	-/+ 1+	17 0	12 0	12 0	17 0	4 1
Color	Yellow	17	12	12	17	5
RBC	- -/+ 1+	13 3 1	9 3 0	12 0 0	17 0 0	5 0 0
WBC	-	17	12	12	17	5
SEC	-/+	17	12	12	17	5
SREC	- -/+	16 1	12 0	12 0	15 2	5 0
Cast	-	17	12	12	17	5
PS	- -/+ 1+ 2+	3 6 7 1	0 7 5 0	0 6 6 0	0 12 3 2	1 3 1 0
CO	-	17	12	12	17	5

Values of volume, specific gravity and water intake are expressed as Mean ± S.D., other values are expressed as No. of animals
 SEC:Squamous cell epithelium, SREC:Small round epithelial cell, PS:Phosphate salts, CO:Calcium oxalate

Table 4 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	Week 6 of administration (mg/kg)				Day 14 of recovery (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Male						
Absolute organ weight						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight(g)	504 ± 33	487 ± 20	468 ± 32	517 ± 35	499 ± 33	516 ± 45
Brain(g)	2.14 ± 0.13	2.05 ± 0.09	2.09 ± 0.04	2.10 ± 0.04	2.16 ± 0.10	2.09 ± 0.11
Thyroids(mg)	24.9 ± 4.2	22.5 ± 4.1	24.9 ± 1.4	29.5 ± 5.2	24.5 ± 5.3	26.7 ± 3.5
Thymus(mg)	370 ± 58	302 ± 49	341 ± 49	391 ± 79	319 ± 128	406 ± 114
Heart(g)	1.42 ± 0.15	1.38 ± 0.10	1.37 ± 0.09	1.41 ± 0.09	1.47 ± 0.16	1.43 ± 0.15
Liver(g)	12.62 ± 1.50	13.01 ± 1.06	12.14 ± 1.05	14.38 ± 1.04	12.28 ± 1.19	13.11 ± 1.61
Spleen(g)	0.80 ± 0.13	0.75 ± 0.12	0.75 ± 0.10	0.82 ± 0.09	0.85 ± 0.14	0.85 ± 0.15
Kidneys(g)	3.50 ± 0.48	3.31 ± 0.21	3.18 ± 0.16	3.60 ± 0.34	3.25 ± 0.26	3.29 ± 0.18
Adrenals(mg)	67 ± 13	64 ± 6	64 ± 13	74 ± 8	63 ± 5	68 ± 9
Number of animals	12	12	12	12	5	5
Body weight(g)	494 ± 28	485 ± 32	488 ± 39	502 ± 29	499 ± 33	516 ± 45
Testes(g)	3.37 ± 0.26	3.33 ± 0.38	3.36 ± 0.30	3.25 ± 0.28	3.44 ± 0.28	3.30 ± 0.45
Epididymis(mg)	1246 ± 112	1231 ± 105	1246 ± 134	1250 ± 99	1351 ± 118	1395 ± 103
Relative organ weight						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Brain(%)	0.43 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.41 ± 0.03
Thyroids(%)	4.9 ± 0.7	4.6 ± 0.8	5.3 ± 0.4	5.7 ± 0.9	4.9 ± 0.8	5.2 ± 0.5
Thymus(%)	74 ± 12	62 ± 11	73 ± 6	75 ± 11	63 ± 21	78 ± 19
Heart(%)	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.02
Liver(%)	2.51 ± 0.23	2.67 ± 0.12	2.60 ± 0.15	2.78 ± 0.19	2.46 ± 0.18	2.53 ± 0.16
Spleen(%)	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.02
Kidneys(%)	0.69 ± 0.06	0.68 ± 0.03	0.68 ± 0.05	0.70 ± 0.04	0.65 ± 0.06	0.64 ± 0.04
Adrenals(%)	13 ± 2	13 ± 1	14 ± 3	14 ± 2	13 ± 1	13 ± 2
Number of animals	12	12	12	12	5	5
Testes(%)	0.68 ± 0.06	0.69 ± 0.07	0.69 ± 0.06	0.65 ± 0.07	0.69 ± 0.05	0.65 ± 0.13
Epididymis(%)	253 ± 28	254 ± 20	257 ± 33	250 ± 25	271 ± 15	272 ± 37
Item	Day 4 of lactation (mg/kg)				Day 14 of recovery (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight(g)	299 ± 16	305 ± 11	306 ± 17	317 ± 10	281 ± 22	294 ± 8
Absolute organ weight						
Brain(g)	1.93 ± 0.08	1.94 ± 0.04	1.91 ± 0.05	1.96 ± 0.06	1.95 ± 0.05	2.01 ± 0.05
Thyroids(mg)	20.9 ± 1.8	19.6 ± 1.5	22.4 ± 6.1	20.0 ± 2.1	15.9 ± 1.8	20.4 ± 3.1*
Thymus(mg)	301 ± 74	262 ± 72	262 ± 56	333 ± 103	329 ± 51	360 ± 50
Heart(g)	0.99 ± 0.05	0.97 ± 0.09	1.01 ± 0.05	1.06 ± 0.12	0.95 ± 0.07	0.95 ± 0.07
Liver(g)	9.70 ± 1.09	10.25 ± 1.06	10.06 ± 0.73	10.72 ± 0.58	7.95 ± 0.49	7.75 ± 0.42
Spleen(g)	0.60 ± 0.05	0.62 ± 0.13	0.73 ± 0.07	0.65 ± 0.03	0.53 ± 0.09	0.48 ± 0.09
Kidneys(g)	2.00 ± 0.12	2.18 ± 0.04	2.33 ± 0.21*	2.36 ± 0.32*	2.09 ± 0.20	2.09 ± 0.10
Adrenals(mg)	87 ± 7	89 ± 10	99 ± 10	101 ± 15	76 ± 11	76 ± 7
Relative organ weight						
Brain(%)	0.65 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.62 ± 0.03	0.62 ± 0.02	0.70 ± 0.06	0.69 ± 0.04
Thyroids(%)	7.0 ± 0.3	6.4 ± 0.6	7.3 ± 1.7	6.3 ± 0.8	5.7 ± 0.4	6.9 ± 1.2
Thymus(%)	100 ± 22	86 ± 25	86 ± 17	105 ± 33	117 ± 15	122 ± 15
Heart(%)	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.04	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.32 ± 0.02
Liver(%)	3.23 ± 0.20	3.36 ± 0.29	3.30 ± 0.28	3.38 ± 0.16	2.83 ± 0.17	2.64 ± 0.15
Spleen(%)	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.05	0.23 ± 0.01*	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.03
Kidneys(%)	0.67 ± 0.04	0.72 ± 0.02	0.76 ± 0.08	0.74 ± 0.08	0.74 ± 0.06	0.71 ± 0.05
Adrenals(%)	29 ± 2	29 ± 4	33 ± 3	32 ± 4	27 ± 3	26 ± 2

Values are expressed as Mean ± S.D.
Significant difference from control group; *p<0.05

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 5 Histopathological findings in rats treated orally with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	Week 6 of administration (mg/kg)								Day 14 of recovery (mg/kg)				
	0			250		500		1000		0		1000	
	P	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Male													
Number of animals necropsied		5			5			5		5		5	
Epididymis	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Cell debris/ duct	0	0	0	-	-	-	-	1	0	-	-	-	-
Femur+marrow	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Fibrosis/ marrow	0	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Heart	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Myocarditis/ focal	0	2	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Kidney	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Basophilia/ tubular	0	3	0	-	-	-	-	1	0	-	-	-	-
Eosinophilic body/ tubular cell	0	0	1	-	-	-	-	2	0	-	-	-	-
Liver	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Vacuolation/ hepatocyte/ periportal	0	3	0	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-
Hematopoiesis/ extramedullary	0	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Microgranuloma	0	4	0	-	-	-	-	3	0	-	-	-	-
Lung(bronchus)	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Accumulation/ foam cell	0	1	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Pituitary	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Pseudocyst/ intermediate	1	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Spleen	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Hematopoiesis/ extramedullary	0	5	0	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-
Stomach	(5)			(5)		(5)		(5)		(5)		(5)	
Cell infiltration	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
Erosion/ glandular stomach	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
Increased number/ globule leukocyte	0	0	1	0	0	2	0	2	2	0	0	3	0
Thickening/ mucosa/ glandular stomach	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
Thickening/ limiting ridge	0	1	0	0	0	2	0	0	5	0	0	5	0
Sternum+marrow	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Fibrosis/ marrow	0	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Testis	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Atrophy/ seminiferous tubular	0	0	0	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-
Urinary bladder	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Hyperplasia/ mucosal	0	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-

1: Slight 2:Mild P:Present (used when grading of severity was not done)

Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.

Table 5 (Continued)

Item	Day 4 of lactation (mg/kg)								Day 14 of recovery (mg/kg)				
	0			250		500		1000		0		1000	
	P	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Female													
Number of animals necropsied		5		5		5		5		5		5	
Femur+marrow	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Fibrosis/ marrow	0	1	0	-	-	-	-	1	0	-	-	-	-
Heart	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Myocarditis/ focal	0	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Kidney	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Basophilia/ tubular	0	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Eosinophilic body/ tubular cell	0	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Liver	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Vacuolation/ hepatocyte/ periportal	0	2	0	-	-	-	-	3	0	-	-	-	-
Hematopoiesis/ extramedullary	0	1	0	-	-	-	-	3	0	-	-	-	-
Microgranuloma	0	4	0	-	-	-	-	3	0	-	-	-	-
Lung(bronchus)	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Accumulation/ foam cell	0	1	0	-	-	-	-	1	0	-	-	-	-
Pituitary	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Pseudocyst/ intermediate	0	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Spleen	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Hematopoiesis/ extramedullary	0	1	4	-	-	-	-	0	5	-	-	-	-
Stomach	(5)			(5)		(5)		(5)		(5)		(5)	
Cell infiltration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erosion/ glandular stomach	0	0	0	2	0	2	0	1	0	1	0	0	0
Increased number/ globule leukocyte	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Thickening/ mucosa/ glandular stomach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thickening/ limiting ridge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sternum+marrow	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Fibrosis/ marrow	0	1	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
Urinary bladder	(5)			(0)		(0)		(5)		(0)		(0)	
Hyperplasia/ mucosal	0	0	0	-	-	-	-	1	0	-	-	-	-

1:Slight 2:Mild P:Present (used when grading of severity was not done)
Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 6 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	Administration period (mg/kg)			
	0	250	500	1000
Number of pairs examined	12	12	12	12
Estrous cycle	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.4	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.3
Irregular estrous cycle	0/12	0/12	0/12	0/12
Number of pairs with successful mating	12	12	12	12
Copulation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	12	12	12	12
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Days until copulation	2.7 ± 1.7	2.6 ± 1.2	2.4 ± 0.9	2.8 ± 1.1

a) Copulation index (%) = (Number of copulated animals / number of mated animals) × 100

b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals / number of copulated females) × 100

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 7 Delivery and litter data in rats treated orally with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	Administration period (mg/kg)			
	0	250	500	1000
Number of females examined	12	12	12	12
Number of females with liveborn	12	12	12	12
Gestation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation period	22.0 ± 0.4	22.3 ± 0.3	22.1 ± 0.3	22.2 ± 0.4
Number of corpora lutea	17.3 ± 1.5	16.7 ± 2.1	17.4 ± 1.5	16.8 ± 2.2
Number of implantations	16.0 ± 1.5	15.7 ± 2.2	16.6 ± 1.9	16.1 ± 1.8
Implantation index (%) ^{b)}	92.9 ± 5.4	94.0 ± 5.1	95.1 ± 5.1	96.4 ± 5.9
Delivery index (%) ^{c)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of liveborn	15.3 ± 1.3	14.3 ± 3.0	14.8 ± 2.9	15.2 ± 1.7
Number of stillborn (%) ^{d)}	1.5 ± 3.8	0.6 ± 1.9	1.0 ± 2.4	1.1 ± 2.7
Number of live pups on day 0	15.3 ± 1.3	14.3 ± 3.0	14.8 ± 2.9	15.2 ± 1.7
Number of pups with external abnormalities (%) ^{e)}	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 1.7
Live birth index (%) ^{f)}	98.5 ± 3.8	99.4 ± 1.9	99.0 ± 2.4	98.9 ± 2.7
Sex ratio ^{g)}	0.58	0.54	0.44*	0.55
Number of live pups on day 4	14.9 ± 1.2	13.8 ± 2.6	14.5 ± 2.6	14.8 ± 1.6
Viability index on day 4 (%) ^{h)}	97.9 ± 3.1	97.0 ± 4.8	98.1 ± 2.9	98.0 ± 5.3
Body weight of pups (g)				
on day 0 male	6.4 ± 0.5	6.9 ± 0.5*	6.7 ± 0.5	6.7 ± 0.4
female	6.2 ± 0.4	6.5 ± 0.5	6.3 ± 0.4	6.3 ± 0.4
on day 4 male	9.8 ± 0.8	10.9 ± 1.5	10.1 ± 1.2	10.1 ± 1.0
female	9.5 ± 1.0	10.2 ± 1.4	9.7 ± 1.2	9.5 ± 1.2

a) Gestation index (%) = (Number of females with liveborn / number of pregnant females) × 100

b) Implantation index (%) = (Number of implantations / number of corpora lutea) × 100

c) Delivery index (%) = (Number of females which delivered live pups / number of pregnant females) × 100

d) Number of stillborn (%) = (Number of stillborn pups / number of stillborn and liveborn pups) × 100

e) Number of pups with external abnormalities (%) = (Number of liveborn pups with external abnormalities / number of liveborn pups) × 100

f) Live birth index (%) = (Number of liveborn pups / number of stillborn and liveborn pups) × 100

g) Sex ratio = Number of males / number of liveborn pups

h) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4 / number of liveborn pups on day 0) × 100

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *p < 0.05

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Amino-2-ethyl-1,3-propanediol in Bacteria

要約

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの遺伝子変異誘発性の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium*(以下、*S.typhimurium*と略す) TA100, TA98, TA1535, TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli*(以下、*E.coli*と略す) WP2 *uvrA*の5菌株を用いて復帰変異誘発試験を実施した。

試験は濃度設定試験及び本試験を実施し、非代謝活性化系及び代謝活性化系存在下の条件で、プレインキュベーション法で実施した。被験物質の溶媒には注射用水を用いた。なお、被験液の処理用量は濃度設定試験で 0.305~5000 µg/plate の範囲で 8 用量、本試験で 156~5000 µg/plate の範囲で 6 用量を設定した。

濃度設定試験において、菌株の種類に関わらず、代謝活性化系存在下で最高用量 5000 µg/plate で白色結晶物の析出が認められた。同様に、本試験においても、菌株の種類に関わらず、代謝活性化系存在下で 2500 µg/plate 以上の被験物質処理群で白色結晶物の析出が認められた。なお、非代謝活性化系存在下においては濃度設定試験及び本試験ともに、菌株の種類に関わらず、全被験物質処理群で沈殿及び結晶物の析出は認められなかつた。また、菌株に対しての増殖抑制は濃度設定試験及び本試験の全被験物質処理群において、菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、認められなかつた。一方、溶媒対照と比較して 2 倍以上かつ用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は濃度設定試験及び本試験の全被験物質処理群において、菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、認められなかつた。

以上の結果より、本試験条件下において 2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは細菌に対して復帰変異誘発性を示さない(陰性)と判定した。

方法

1. 試験菌株

試験菌株としてヒスチジン要求性の *S. typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537) 並びにトリプトファン要求性の *E. coli* WP2 *uvrA*の5種類を選択した。

これらの菌株はいずれも 1997 年 10 月 9 日に国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部から入手した。試験菌株は -80°C 設定の超低温フリーザで保存したものを用いた。各菌株は、アミノ酸要求性、紫外線(UV)感受性、膜変異(rfa)及びアンピシリン耐性因子 pKM101(プラス

ミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、解凍した菌液をニュートリエントプロス No.2 (UNIPATH LTD.)を入れた培養用三角フラスコに一定量を接種し、37°Cで約 8 時間振盪培養したものを検定菌液とした。なお、分光光度計を用いて 660 nm の吸光度を測定し、試験菌液の増殖を確認した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

最少グルコース寒天平板培地はオリエンタル酵母工業から購入し、試験に用いた。本プレート組成は、Vogel-Bonner の最少培地 E を含む水溶液(最終濃度: 0.02 % 硫酸マグネシウム 7 水塩, 0.2 % クエン酸 1 水塩, 1 % リン酸二カリウム 無水塩, 0.192 % リン酸一アンモニウム, 0.06 % 水酸化ナトリウム)に 2 % グルコース(和光純薬工業)及び 1.5 % の寒天(伊那食品工業)を加え、径 90 mm の滅菌シャーレ当たり 30 mL を分注して固めたものである。

2) アミノ酸添加軟寒天培地(トップアガー)

0.6 w/v% 寒天粉末(Difco)及び 0.6 w/v% 塩化ナトリウム(和光純薬工業)の組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium*用には 0.5 mmol/L D-ビオチン(和光純薬工業)及び 0.5 mmol/L L-ヒスチジン(和光純薬工業)水溶液、*E. coli*用には 0.5 mmol/L L-トリプトファン(ナカライトスク)水溶液を 1/10 容量加え、トップアガーとした。

3. S9 mix

フェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンを 7 週齢投与した Sprague-Dawley 系雄ラットに腹腔内投与した肝臓から調製された S9 並びに補酵素をオリエンタル酵母工業から購入し、S9 mix を調製した。

4. 被験物質

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオール(ロット番号:HDE01, 製造元: 東京化成工業, 東京)は純度 99.4 wt%, 微黄色透明の粘性の液体で、冷暗所に保存した。

5. 被験液の調製

溶媒は、注射用水(日本薬局方, 大塚製薬工場)を用いた。被験物質を溶媒で希釈して原液(50.0 mg/mL)を調製し、次いで順次溶媒で希釈して各濃度の被験液を調製

した。

6. 試験用量の設定

濃度設定試験は、最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ として注射用水により以下公比 4 で 7 段階希釈した計 8 用量を設定した。本試験では、濃度設定試験において菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、菌の増殖抑制が認められなかったため、原液の最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ として以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。

7. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した 5 種類の化学物質を使用した。

2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide	(AF-2, 和光純薬工業)
Sodium azide	(SAZ, 和光純薬工業)
2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-amino-propylamino]acridine·2HCl	(ICR-191, Polysciences)
2-aminoanthracene	(2AA, ナカライテスク)
Benzo[a]pyrene	(B[a]P, ナカライテスク)
AF-2, ICR-191, 2AA, B[a]P	はジメチルスルホキシド(試薬特級, 和光純薬工業)を用いて溶解し, SAZ は, 注射用水(日本薬局方, 大塚製薬工場)により溶解し, 目的の濃度に調製した。

8. 試験方法

Ames らの原法の改良法^{1,2)}であるプレインキュベーション法に準じて、非代謝活性化群及び代謝活性化群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μL , 次いで非代謝活性化群の場合、0.1mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)を 500 μL , 代謝活性化群の場合、S9 mix を 500 μL 添加した。さらに、試験菌液を 100 μL 加え、37°Cで 20 分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、あらかじめ 45°C に保温したトップアガーを 2 mL 添加し、混合液をプレート上に重層した。37°Cで 48 時間培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害及び沈殿/結晶の析出の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。次いで、復帰変異により生じたコロニーを計数した。計数に際しては白色の結晶物が析出したため、肉眼により手動で計数した。各濃度につき 3 枚のプレートを使用した。

9. 結果判定

復帰変異コロニー数が溶媒対照のほぼ 2 倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。なお、判定に際しては統計学的処理は行わなかった。

結果及び考察

濃度設定試験の結果を Table 1 に、本試験の結果を Table 2 に示した。

濃度設定試験の結果、菌株の種類に関わらず、代謝活性化系存在下で最高用量 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で白色結晶物の析出が認められた。同様に、本試験においても、菌株の種類に関わらず、代謝活性化系存在下で 2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の被験物質処理群で白色結晶物の析出が認められた。なお、非代謝活性化系存在下では濃度設定試験及び本試験とともに、菌株の種類に関わらず、全被験物質処理群で、沈殿及び結晶物の析出は認められなかつた。そして、菌株に対しての増殖抑制は濃度設定試験及び本試験の全被験物質処理群において、菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、認められなかつた。また、溶媒対照と比較して 2 倍以上かつ用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は濃度設定試験及び本試験の全被験物質処理群において認められなかつた。

一方、陽性対照群では各菌株の溶媒対照群に比較して 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。更に、各菌株の代謝活性化及び非代謝活性化における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は当試験実施施設における背景データと比較し異常と考えられる数値が認められず、試験は適切に実施されたものと考えられた。

なお、化学構造的に本被験物質と類似物質である *tert*-butyl hydroperoxide(CAS Registry No. 75-91-2)は、染色体異常試験³⁾で陽性の結果が⁴⁾、isopropyl alcohol(CAS Registry No. 67-63-0)は細菌を用いる復帰変異試験⁴⁾及び姉妹染色分体交換試験⁵⁾で陰性の結果が、acetone cyanohydrin(CAS Registry No. 75-86-5)は細菌を用いる復帰変異試験⁶⁾で陰性の結果がそれぞれ報告されている。

以上の試験結果より、本試験条件下において 2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは細菌に対して遺伝子変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

文献

- Maron DM, Ames BN:Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Res, 113:173-215(1983).
- Matsushima T, Sugimura T, Nagao M et al. : Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens", eds. Norpeth KH, Garner RC(eds.), Springer, Berlin(1980)pp.273-285.
- Ochi T:Effects of iron chelators and glutathione depletion on the induction and repair of chromosomal aberrations by *tert*-butyl hydroperoxide in cultured Chinese hamster cells. Mutation Res, 213:243-248(1989).
- Shimizu H, Suzuki Y, Takemura N, Goto S Matsushita H:Results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals. Sangyo Igaku, 27:400-419(1985).

- 5) Von der Hude W, Scheutwinkel M, Gramlich U et al.: Genotoxicity of three-carbon compounds evaluated in the SCE test *in vitro*. Environ Mutagen, 9:401-410(1987).
- 6) Zeiger E, Anderson B, Haworth S et al.: Salmonella mutagenicity tests: IV: results from the testing of 300 chemicals. Environ Mol Mutagen, 11 (Suppl 12):1-157(1988).

連絡先

試験責任者：望月 肇

試験担当者：中村香織，高部道仁

(株)ボゾリサーチセンター

〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284

Tel & Fax 0550-82-9922

Correspondance

Authors: Hajime Mochizuki (Study Director)

Kaori Nakamura, Michihito Takabe

Bozo Research Center Inc., 1284 Kamado,

Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039, Japan

Tel & Fax +81-550-82-9922

復帰変異試験

Table 1 Results of the dose -range finding test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol without or with metabolic activation in the bacterial reverse mutation test

S9 mix	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate (Mean \pm Standard Deviation)				
		Base-pair substitution type		Frameshift type		
		<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 uvrA	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
(-)	0 ^{a)}	99 89 87 (92 \pm 6.4)	9 14 11 (11 \pm 2.5)	19 28 28 (25 \pm 5.2)	24 25 22 (24 \pm 1.5)	7 5 8 (7 \pm 1.5)
	0.305	99 89 102 (97 \pm 6.8)	9 9 8 (9 \pm 0.6)	22 26 23 (24 \pm 2.1)	22 17 23 (21 \pm 3.2)	8 10 10 (9 \pm 1.2)
	1.22	106 91 95 (97 \pm 7.8)	7 9 8 (8 \pm 1.0)	23 28 28 (26 \pm 2.9)	14 19 19 (17 \pm 2.9)	8 9 9 (9 \pm 0.6)
	4.88	86 106 108 (100 \pm 12.2)	8 11 15 (11 \pm 3.5)	26 28 31 (28 \pm 2.5)	18 20 17 (18 \pm 1.5)	12 7 11 (10 \pm 2.6)
	19.5	99 108 93 (100 \pm 7.5)	10 10 10 (10 \pm 0.0)	21 19 21 (20 \pm 1.2)	18 15 14 (16 \pm 2.1)	10 11 11 (11 \pm 0.6)
	78.1	106 104 106 (105 \pm 1.2)	9 12 11 (11 \pm 1.5)	21 27 22 (23 \pm 3.2)	12 17 22 (17 \pm 5.0)	10 12 10 (11 \pm 1.2)
	313	97 78 81 (85 \pm 10.2)	9 10 10 (10 \pm 0.6)	28 25 24 (26 \pm 2.1)	15 16 16 (16 \pm 0.6)	10 7 7 (8 \pm 1.7)
	1250	104 96 110 (103 \pm 7.0)	13 11 10 (11 \pm 1.5)	31 32 24 (29 \pm 4.4)	17 20 15 (17 \pm 2.5)	10 7 8 (8 \pm 1.5)
	5000	103 91 101 (98 \pm 6.4)	13 9 10 (11 \pm 2.1)	18 18 20 (19 \pm 1.2)	19 15 21 (18 \pm 3.1)	7 8 7 (7 \pm 0.6)
	0 ^{a)}	102 109 112 (108 \pm 5.1)	10 12 17 (13 \pm 3.6)	29 28 31 (29 \pm 1.5)	23 24 29 (25 \pm 3.2)	15 14 10 (13 \pm 2.6)
	0.305	116 120 106 (114 \pm 7.2)	9 10 12 (10 \pm 1.5)	30 31 31 (31 \pm 0.6)	21 26 23 (23 \pm 2.5)	10 11 9 (10 \pm 1.0)
(+)	1.22	107 111 113 (110 \pm 3.1)	13 17 10 (13 \pm 3.5)	22 30 25 (26 \pm 4.0)	19 18 18 (18 \pm 0.6)	12 9 18 (13 \pm 4.6)
	4.88	105 97 107 (103 \pm 5.3)	8 12 10 (10 \pm 2.0)	29 26 23 (26 \pm 3.0)	21 23 19 (21 \pm 2.0)	10 13 14 (12 \pm 2.1)
	19.5	125 112 103 (113 \pm 11.1)	11 10 9 (10 \pm 1.0)	27 23 22 (24 \pm 2.6)	20 27 20 (22 \pm 4.0)	9 12 14 (12 \pm 2.5)
	78.1	119 103 94 (105 \pm 12.7)	12 11 9 (11 \pm 1.5)	31 31 28 (30 \pm 1.7)	23 33 24 (27 \pm 5.5)	12 14 11 (12 \pm 1.5)
	313	105 104 107 (105 \pm 1.5)	10 8 10 (9 \pm 1.2)	24 31 24 (26 \pm 4.0)	18 22 28 (23 \pm 5.0)	14 13 16 (14 \pm 1.5)
	1250	89 99 107 (98 \pm 9.0)	13 9 13 (12 \pm 2.3)	20 19 26 (22 \pm 3.8)	19 15 18 (17 \pm 2.1)	12 10 12 (11 \pm 1.2)
	5000	106† 101† 104† (104 \pm 2.5)	11† 10† 11† (11 \pm 0.6)	21† 29† 29† (26 \pm 4.6)	21† 19† 25† (22 \pm 3.1)	11† 9† 9† (10 \pm 1.2)
	Positive control	AF-2 ^{b)}	SAZ ^{c)}	AF-2 ^{b)}	AF-2 ^{b)}	ICR-191 ^{d)}
	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of revertant colonies/plate	423 439 481 (448 \pm 30.0)	320 323 347 (330 \pm 14.8)	344 333 356 (344 \pm 11.5)	378 401 400 (393 \pm 13.0)	1431 1389 1490 (1437 \pm 50.7)
(+)	Positive control	B[a]P ^{e)}	2AA ^{f)}	2AA ^{f)}	B[a]P ^{e)}	B[a]P ^{e)}
	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of revertant colonies/plate	490 468 480 (479 \pm 11.0)	117 109 112 (113 \pm 4.0)	443 450 459 (451 \pm 8.0)	347 355 341 (348 \pm 7.0)	124 109 113 (115 \pm 7.8)

a)Vehicle control (=Water for injection)

b)AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, c)SAZ:Sodium azide, d)ICR-191:2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine · 2HCl, e)B[a]P:Benzo[a]pyrene, f)2AA:2-Aminoanthracene

† Deposition of crystals was observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 2 Results of the main test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol without or with metabolic activation in the bacterial reverse mutation test

S9 mix	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate (Mean \pm Standard Deviation)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 uvrA	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
(-)	0 ^a	106 96 137 (113 \pm 21.4)	11 10 9 (10 \pm 1.0)	31 25 31 (29 \pm 3.5)	14 16 20 (17 \pm 3.1)	13 12 10 (12 \pm 1.5)
	156	96 118 117 (110 \pm 12.4)	9 7 9 (8 \pm 1.2)	30 25 29 (28 \pm 2.6)	14 13 10 (12 \pm 2.1)	10 10 8 (9 \pm 1.2)
	313	93 112 118 (108 \pm 13.1)	7 11 7 (8 \pm 2.3)	28 22 29 (26 \pm 3.8)	11 11 18 (13 \pm 4.0)	13 11 15 (13 \pm 2.0)
	625	109 111 102 (107 \pm 4.7)	7 6 8 (7 \pm 1.0)	28 27 27 (27 \pm 0.6)	15 18 15 (16 \pm 1.7)	11 9 10 (10 \pm 1.0)
	1250	115 106 120 (114 \pm 7.1)	8 5 9 (7 \pm 2.1)	31 28 22 (27 \pm 4.6)	10 12 16 (13 \pm 3.1)	8 9 12 (10 \pm 2.1)
	2500	116 116 112 (115 \pm 2.3)	6 8 14 (9 \pm 4.2)	31 23 30 (28 \pm 4.4)	12 15 18 (15 \pm 3.0)	8 10 12 (10 \pm 2.0)
	5000	120 117 106 (114 \pm 7.4)	6 6 9 (7 \pm 1.7)	20 22 16 (19 \pm 3.1)	15 10 12 (12 \pm 2.5)	11 11 8 (10 \pm 1.7)
	0 ^a	130 128 119 (126 \pm 5.9)	13 13 12 (13 \pm 0.6)	27 32 27 (29 \pm 2.9)	18 22 20 (20 \pm 2.0)	11 15 10 (12 \pm 2.6)
	156	120 125 123 (123 \pm 2.5)	8 7 8 (8 \pm 0.6)	24 27 29 (27 \pm 2.5)	20 19 19 (19 \pm 0.6)	15 15 12 (14 \pm 1.7)
	313	130 138 114 (127 \pm 2.2)	8 7 8 (8 \pm 0.6)	28 21 29 (26 \pm 4.4)	20 19 22 (20 \pm 1.5)	11 15 13 (13 \pm 2.0)
(+)	625	107 112 100 (106 \pm 6.0)	10 9 7 (9 \pm 1.5)	25 22 27 (25 \pm 2.5)	17 18 21 (19 \pm 2.1)	10 10 12 (11 \pm 1.2)
	1250	129 132 113 (125 \pm 10.2)	12 8 9 (10 \pm 2.1)	25 21 19 (22 \pm 3.1)	25 22 21 (23 \pm 2.1)	11 12 14 (12 \pm 1.5)
	2500	124† 125† 130† (126 \pm 3.2)	10† 6† 9† (8 \pm 2.1)	18† 17† 21† (19 \pm 2.1)	20† 18† 15† (18 \pm 2.5)	15† 12† 9† (12 \pm 3.0)
	5000	134† 126† 144† (135 \pm 9.0)	6† 5† 9† (7 \pm 2.1)	25† 19† 18† (21 \pm 3.8)	17† 12† 12† (14 \pm 2.9)	9† 13† 9† (10 \pm 2.3)
	Positive control	AF-2 ^b	SAZ ^c	AF-2 ^b	AF-2 ^b	ICR-191 ^d
	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of revertant colonies/plate	467 452 488 (469 \pm 18.1)	144 213 172 (176 \pm 34.7)	265 206 234 (235 \pm 29.5)	360 355 374 (363 \pm 9.8)	1338 1063 1181 (1194 \pm 138.0)
(+)	Positive control	B[a]P ^e	2AA ^f	2AA ^f	B[a]P ^e	B[a]P ^e
	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of revertant colonies/plate	612 648 603 (621 \pm 23.8)	122 130 98 (117 \pm 16.7)	421 403 398 (407 \pm 12.1)	247 242 253 (247 \pm 5.5)	113 117 104 (111 \pm 6.7)

a) Vehicle control (=Water for injection)

b) AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, c) SAZ: Sodium azide, d) ICR-191:2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine · 2HCl, e) B[a]P: Benzol[a]pyrene, f) 2AA: 2-Aminoanthracene

† Deposition of crystals was observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

Chromosomal Aberration Test of 2-Amino-2-ethyl-1,3-propanediol in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの染色体異常誘発能の有無を検討するために、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU細胞)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験を行った結果、短時間処理法及び連続処理法の24時間処理では50%細胞増殖抑制濃度は $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ (10mM相当)以上、連続処理法の48時間処理では $1075\text{ }\mu\text{g/mL}$ であった。このことから染色体異常試験における2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの濃度は短時間処理法及び連続処理法ともに公比2で $5\sim 1200\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲に設定した。短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化について被験物質を6時間処理した18時間後、連続処理法では被験物質を24時間及び48時間連続処理後、それぞれ染色体標本を作製して検鏡し、染色体異常誘発性を検討した。

試験の結果、短時間処理法及び連続処理法のいずれの処理方法によっても、染色体の構造異常及び倍数性細胞の誘発は認められなかった。

以上の結果から、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは本試験条件下において染色体異常誘発能を有さない(陰性)と結論した。

材料及び方法

1. 使用細胞株

ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手(2001年12月26日)したチャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞株(CHL/IU細胞)を用いた。なお、試験には細胞増殖抑制試験で16継代目、染色体異常試験で20及び28継代目の細胞を使用した。

2. 培養液の調製

培養には、非動化(56°C , 30分)した仔牛血清(Invitrogen)を10 vol%添加したEagle's MEM(Life Technologies)を用いた。調製後の培養液の保存は冷蔵とした。

3. 培養条件

細胞は、炭酸ガス培養装置を用い、 CO_2 濃度5%，温度 37°C の高湿度条件下で培養した。継代培養は3~4日ごとに行った。試験に際しては 2×10^4 個の細胞を、培養液5 mLを入れた直径6 cmのプラスチックプレートに播

種し、3日目に被験物質を処理した。

4. S9 mix

フェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボンを7週齢のSprague Dawley系雄ラットに腹腔内投与した肝臓から調製されたS9並びに補酵素をオリエンタル酵母工業から購入し、S9 mixを調製した。S9 mixの組成は松岡らの方法¹⁾に従いS9の培地への添加量を5 vol%とした。

5. 被験物質

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオール(ロット番号:HDE01, 東京化成工業, 東京)は、純度99.4%，微黄色透明、粘性の液体で、冷暗所に保存した。

6. 被験液の調製

溶媒は、生理食塩液(日本薬局方、大塚製薬工場)を用いた。被験物質を溶媒で希釈して原液(120 mg/mL)を調製し、ついで順次溶媒で希釈して各濃度の被験液を調製した。被験液は、培養液の1 vol%になるように添加した。

7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質の細胞増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(モノセレータ、オリンパス光学工業)を用いて細胞密度を測定し、被験物質処理群の陰性(媒体)対照群に対する細胞密度の比をもって指標とした。

その結果、50%細胞増殖抑制濃度は短時間処理法及び連続処理法の24時間処理では $1200\text{ }\mu\text{g/mL}$ (10mM相当)以上、連続処理法の48時間処理では $1075\text{ }\mu\text{g/mL}$ であった(Fig. 1, 2)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験で得られた50%細胞増殖抑制濃度をもとに、染色体異常試験では短時間処理法及び連続処理法のいずれにおいても $1200\text{ }\mu\text{g/mL}$ (10mM相当)を最高濃度とし、以下公比2で希釈した計5濃度並びに陰性(媒体)対照群を設定した。なお、陽性対照として+S9 mix処理ではシクロフォスファミド(CP, 和光純薬工業, $15\text{ }\mu\text{g/mL}$)、-S9 mix処理ではマイトマイシンC(MMC, 協和酵素工業, $0.05\text{ }\mu\text{g/mL}$)を用いた。

濃度当たり4枚のプレートに処理し、2枚を染色体標本作製用、2枚を細胞増殖率測定用とした。

9. 染色体標本の作製

培養終了の2時間前に、最終濃度が $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ となるようコルセミドを加えた。以下、染色体標本は空気乾燥法によって作製した。スライド標本は各プレートにつき2枚作製し、2 vol% ギムザ液で15分間染色した。

10. 染色体の観察

各用量当たり200個(プレート当たり100個)の分裂中期像についてギャップ(gap), 染色分体型切断(ctb), 染色分体型交換(cte), 染色体型切断(csb), 染色体型交換(cse)及びその他の異常など構造異常の種類並びに異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数性細胞の数も記録した。

客観的な観察を行うため、スライド標本をコード化した状態で分析した。

11. 結果の判定

染色体構造異常を有する細胞の出現率は、ギャップを含む場合と含まない場合について集計し、ギャップを含まない場合で判定した。

判定は石館らの基準²⁾に従い、染色体異常を有する細胞の出現頻度が5 %未満を陰性(-), 5 %以上10 %未満を疑陽性(±), 10 %以上を陽性(+)とした。最終的には異常細胞の出現に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

結果及び考察

短時間処理法の結果をTable 1及び2に、連続処理法の結果をTable 3及び4に示した。いずれの処理方法においても、被験物質処理群には染色体構造異常の出現頻度に5 %を越える増加は認められなかった。また、倍数性細胞の出現頻度にも増加は認められなかった。一方、陽性対照物質を処理した群においては顕著な染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加が認められた。

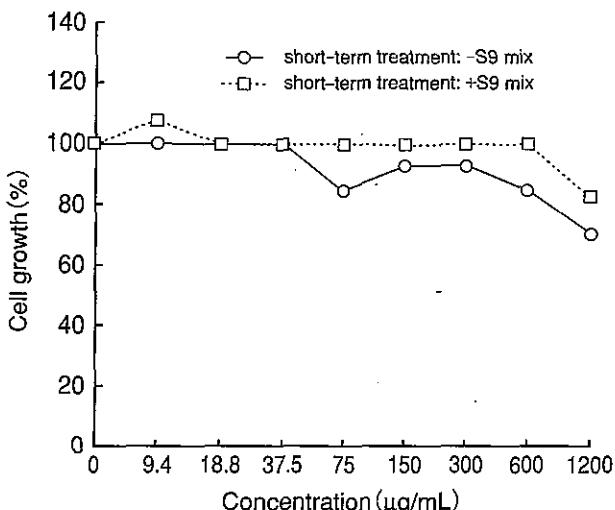


Fig. 1 Cell growth inhibition treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [short-term treatment: 6 hr]

なお、化学構造的に本被験物質と類似物質である *tert*-butyl hydroperoxide(CAS Registry No. 75-91-2)は、染色体異常試験³⁾で陽性の結果が、isopropyl alcohol(CAS Registry No. 67-63-0)は細菌を用いる復帰突然変異試験⁴⁾及び姉妹染色分体交換試験⁵⁾で陰性の結果が、acetone cyanohydrin(CAS Registry No. 75-86-5)は細菌を用いる復帰突然変異試験⁶⁾で陰性の結果がそれぞれ報告されている。

以上の結果から、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは本試験条件下において染色体異常誘発能を有さない(陰性)と判定した。

文献

- 1) Matsuoka A et al.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. Mutation Res, 66:277-290(1979).
- 2) 石館基(監修):「染色体異常試験データ集」エル・アイ・シー、東京(1987)pp.19-24
- 3) Ochi T: Effects of iron chelators and glutathione depletion on the induction and repair of chromosomal aberrations by *tert*-butyl hydroperoxide in cultured Chinese hamster cells. Mutation Res, 213:243-248(1989).
- 4) Shimizu H et al.: Results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals. Sangyo Igaku, 27:400-419(1985).
- 5) von der Hude W: Genotoxicity of three-carbon compounds evaluated in the SCE test *in vitro*. Environ Mutagen, 9:401-410(1987).
- 6) Zeiger E et al.: *Salmonella* mutagenicity tests: IV: results from the testing of 300 chemicals. Environ Mol Mutagen, 11:1-157(1988).

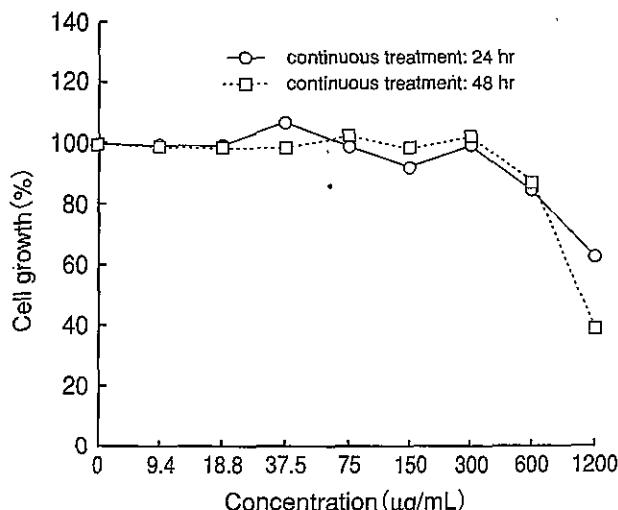


Fig. 2 Cell growth inhibition treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [continuous treatment]

連絡先

試験責任者：園 明
試験担当者：樋川奈穂美，高部道仁，石井孝広，
勝亦俱慶
(株)ボゾリサーチセンター
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284
Tel & Fax 0550-82-9922

Correspondence

Authors: Akira Sono (Study Director)
Naomi Hikawa, Michihito Takabe,
Takahiro Ishii, Tomoyoshi Katsumata
Bozo Research Center Inc.
1284 Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039,
Japan
Tel & Fax +81-550-82-9922

Table 1 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 6 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [short-term treatment:-S9 mix]

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells ^b (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline ^a	0	6-18	100	200	2	0	0	0	0	0	1.0	0.0	1.0	-
Test substance	75.0	6-18	107	200	0	0	2	0	1	0	1.5	1.5	0.0	-
	150	6-18	93	200	1	0	1	0	0	0	1.0	0.5	0.5	-
	300	6-18	100	200	2	0	2	0	0	0	2.0	1.0	0.0	-
	600	6-18	93	200	2	0	2	0	0	0	2.0	1.0	0.5	-
	1200	6-18	85	200	2	1	2	0	0	0	2.5	1.5	1.5	-
CP	15	6-18	93	200	6	32	148	2	1	0	79.0	79.0	0.0	+

Abbreviation; CP:cyclophosphamide (positive control), ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

Table 2 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 6 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [short-term treatment:-S9 mix]

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells ^b (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline ^a	0	6-18	100	200	3	1	0	0	1	0	2.5	1.0	0.5	-
Test substance	75.0	6-18	93	200	3	1	1	0	0	0	2.5	1.0	0.0	-
	150	6-18	93	200	3	3	0	0	0	0	3.0	1.5	0.0	-
	300	6-18	86	200	4	1	0	0	0	0	2.5	0.5	0.5	-
	600	6-18	86	200	2	1	0	0	1	0	2.0	1.0	0.5	-
	1200	6-18	79	200	1	3	0	0	0	0	2.0	1.5	0.5	-
MMC	0.05	6-18	79	200	4	20	31	0	1	0	25.0	24.0	1.5	+

Abbreviation; MMC:mitomycin C (positive control), ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

染色体異常試験

Table 3 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 24 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment:24hr]

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells ^{b)} (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline ^{a)}	0	24	100	200	4	1	2	0	1	0	4.0	2.0	0.0	-
Test substance	75.0	24	89	200	5	0	1	0	0	0	3.0	0.5	0.5	-
	150	24	89	200	4	1	0	0	1	0	3.0	1.0	1.0	-
	300	24	111	200	3	0	1	0	1	0	2.5	1.0	0.0	-
	600	24	89	200	4	0	1	0	0	0	2.5	0.5	1.5	-
	1200	24	67	81	1	1	2	0	0	0	4.9	3.7	1.2	TOX
MMC	0.05	24	89	200	7	40	60	1	4	1	43.5	42.0	0.0	+

Abbreviation; MMC:mitomycin C (positive control), ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange.

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

Table 4 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 48 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
[continuous treatment:48hr]

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells ^{b)} (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline ^{a)}	0	48	100	200	5	0	0	0	1	0	3.0	0.5	1.0	-
Test substance	75.0	48	100	200	3	0	0	0	0	0	1.5	0.0	0.0	-
	150	48	106	200	2	0	0	0	1	0	1.5	0.5	0.0	-
	300	48	106	200	5	0	1	0	2	0	4.0	1.5	0.5	-
	600	48	100	200	2	1	0	0	0	0	1.5	0.5	1.5	-
	1200	48	50	84	1	0	0	0	3	0	4.8	3.6	3.6	TOX
MMC	0.05	48	94	200	10	50	108	3	2	0	68.0	66.5	1.0	+

Abbreviation; MMC:mitomycin C (positive control), ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

O,O'-ジエチルジチオリン酸のラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of O,O'-Diethyl dithiophosphate in Rats

要約

*O,O'-ジエチルジチオリン酸*を雌ラットに1回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は、第1回試験は2000 mg/kg、第2回試験は300 mg/kg、第3回試験は300 mg/kgとした。媒体には1.0 vol% Tween 80を含む0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を用いた。各群の使用動物数は各3例とした。

死亡例は、2000 mg/kg投与で投与後1日までに3例全例に認められた。

一般状態において、2000 mg/kg投与で流涎、自発運動の低下、腹臥位、チアノーゼおよび緩徐呼吸がみられた。300 mg/kg投与では、投与直後に流涎がみられた。300 mg/kg投与では、体重推移に異常はみられなかった。剖検において、2000 mg/kg投与で胃穿孔、腺胃粘膜暗赤色斑、腺胃粘膜肥厚、前胃粘膜肥厚および腹水貯留がみられた。300 mg/kg投与では、異常はみられなかつた。

以上の結果から、*O,O'-ジエチルジチオリン酸*の急性毒性は、GHSのカテゴリー4に分類される。

方法

1. 被験物質および媒体

*O,O'-ジエチルジチオリン酸*は、暗青色のメルカプタン臭を有する強酸の液体であり、ほとんどの有機溶剤に可溶、水にもわずかに可溶である[Lot No. ASK5069、純度:98.9 %、密度:1.180 g/mL(20 °C)、和光純薬工業(大阪)]。入手後は、冷蔵・遮光の条件下で保管した。投与終了後に被験物質を分析し、使用期間中安定であったことを確認した。

*O,O'-ジエチルジチオリン酸*は、1.0 vol% Tween 80を含む0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液で所定濃度となるように、懸濁して調製した。なお、被験物質の調製に際して、純度による換算を実施した。1および200 mg/mLの調製液は、調製後、冷蔵、遮光および気密の条件下で7日間保管後、さらに室温、遮光および気密の条件下で24時間保管しても安定性に問題のないことが確認されている。投与検体は、用時調製とし、調製後6時間以内に使用した。

投与に使用した投与検体中の被験物質濃度を測定した結果、被験物質濃度に問題はなかった。

2. 使用動物および飼育条件

7週齢のCrj:CD(SD)IGS雌ラット(SPF)を日本チャーリス・リバーから購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後2日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常の認められなかつた動物を群分けした。群分けは、第1回試験、第2回試験および第3回試験とも投与日にコンピュータを用いて無作為抽出法により行った。

動物は、室温20~26 °C、湿度40~70 %、明暗各12時間(照明:午前6時~午後6時)、換気回数12回/時に維持された飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中および群分け後とも、ステンレス製ケージを用いて個別飼育した飼料は、固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業)を自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻から投与までの約19時間と投与後約6時間まで絶食した。飲料水は、水道水を自由に摂取させた。ただし、群分け時から投与後約6時間までは絶水した。

3. 投与経路、投与方法および投与量

投与経路は、経口投与を選択した。投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、投与直前に測定した体重を基準として10 mL/kgで算出した。投与回数は1回とした。投与日の週齢は8週齢であり、体重範囲は169~179 gであった。

*O,O'-ジエチルジチオリン酸*のラット経口投与によるLD₅₀値は4510 mg/kgとの情報がある¹⁾。従って、OECD Test Guideline 423で最高用量とされている2000 mg/kgを第1回試験の投与量とした。第1回試験の2000 mg/kg投与で3例全例が死亡したため、300 mg/kgを第2回試験の投与量とした。第2回試験の300 mg/kg投与で死亡例が認められなかつたため、300 mg/kgを第3回試験の投与量とした。各試験の動物数は、3例とした。

4. 観察および検査項目

1) 観察期間

投与後14日間とした。

2) 一般状態

投与日は投与後6時間(投与直後~投与後30分、投与後2, 4および6時間)まで、投与翌日からの観察期間中は1日1回、一般状態および死亡の有無を観察した。

単回経口投与毒性試験

Table 1 Mortality of female rats in single dose oral toxicity test of *O,O'*-diethyl dithiophosphate

Group	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of deaths						Total number of deaths
			0~0.5	2	4	6	1	2	
Test group 1	2000	3	0	0	0	2	1	-	3
Test group 2	300	3	0	0	0	0	0	0	0
Test group 3	300	3	0	0	0	0	0	0	0

3) 体重測定

投与日(投与直前)ならびに投与後1, 3, 7, 10および14日に測定した。

生存例では、異常はみられなかった。

4) 剖検

死亡動物は、速やかに剖検した。生存動物は、観察期間終了日にジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

5. 統計解析

LD₅₀値は概略の範囲を推定した。

体重は、各群で平均値および標準偏差を算出した。

考察

O,O'-ジエチルジチオリン酸の急性毒性は、GHSのカテゴリー4に分類される。

O,O'-ジエチルジチオリン酸の2000 mg/kg投与により、流涎、自発運動の低下、腹臥、緩徐呼吸およびチアノーゼ、剖検で胃穿孔、腺胃粘膜暗赤色斑、腺胃粘膜肥厚、前胃粘膜肥厚および腹水貯留が認められたことから、*O,O'*-ジエチルジチオリン酸は消化管粘膜に対して直接的な刺激作用を有し、この作用に基づく消化管障害により死に至ったと考えられる。

結果

1. 死亡状況、LD₅₀値および一般状態(Table 1)

死亡例は、第1回試験の2000 mg/kg投与で投与後6時間に2例と投与後1日に1例の全例に認められた。第2回試験および第3回試験の300 mg/kg投与では、死亡例は認められなかった。*O,O'*-ジエチルジチオリン酸のLD₅₀値は、300 mg/kgと2000 mg/kgの間にいると推定される。

一般状態において、第1回試験の2000 mg/kg投与で投与直後に流涎が2例、投与後約5分に自発運動の低下および腹臥位が各1例、投与後2時間に腹臥位が2例と自発運動の低下が1例、投与後4時間に緩徐呼吸が3例、腹臥位およびチアノーゼが各2例と自発運動の低下が1例、投与後6時間に腹臥位および緩徐呼吸が1例にみられた。第2回試験の300 mg/kg投与では、異常はみられなかった。第3回試験の300 mg/kg投与では、投与直後に流涎が1例にみられたが、投与2時間以降に異常は認められなかった。

2. 体重

第2回試験および第3回試験の300 mg/kg投与では、体重は順調に推移した。

3. 剖検

第1回試験の2000 mg/kg投与による死亡例では、腺胃粘膜肥厚が3例、胃穿孔、腺胃粘膜暗赤色斑および腹水貯留が各2例と前胃粘膜肥厚が1例にみられた。

第2回試験および第3回試験の300 mg/kg投与による

文献

1) 和光純薬工業、未発表。

連絡先

試験責任者：古橋忠和

試験担当者：藤村高志、内藤一嘉、吉島賢一

（株）日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6-104

Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)

Takashi Fujimura, Kazuyoshi Naito,

Ken-ichi Yoshijima

Nihon Bioresearch Inc.

6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu,

501-6251, Japan

Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

O,O'-ジエチルジチオリン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

Combined Repeated Dose Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of *O,O'-Diethyl dithiophosphate* by Oral Administration in Rats

要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、*O,O'-ジエチルジチオリン酸*の0(溶媒の1.0 vol% Tween 80を含む0.5 w/v% CMC-Na水溶液のみ投与)、30, 100および300 mg/kg/dayをラットの交配前14日から交配期間、妊娠期間および哺育4日まで連続強制経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性に及ぼす影響を検討した。また、投与終了の翌日から対照群および300 mg/kg群の雌雄各5例について14日間観察を継続し、休薬による毒性の回復性についても検討した。

1. 反復投与毒性

投与期間中に雌の300 mg/kg群で6例の死亡動物および2例の切迫解剖動物が認められた。これらの動物の剖検所見および組織所見より主な死因には、気道の急性炎症による窒息死と消化管障害に伴う栄養状態の悪化の二種類が考えられた。

被験物質投与に起因する一般状態の変化として、雌雄の30 mg/kg以上の投与群で流涎、雌雄の300 mg/kg群で軟便が観察された。

体重では、300 mg/kg群の雄では投与期間を通じて、雌では交配前投与期間に体重増加抑制が認められ、被験物質投与の影響が示唆された。

摂餌量では、雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

機能観察総合検査では、詳細な症状観察で雌雄とともに100および300 mg/kg群で一般状態と同様に流涎を示す動物数の増加が認められた。また、雌の300 mg/kg群で移動量の軽度な減少を示す動物数の増加が認められ、同群の投与期間終了時および哺育4日の自発運動量が低値を示したことから、被験物質投与に起因すると考えられる自発運動の低下が認められた。運動感覚反応の観察および握力には被験物質投与との影響は認められなかった。

血液学検査では、雄の投与期間終了時において300 mg/kg群でヘモグロビン量および赤血球数が低値を示した。回復期間終了時では、300 mg/kg群で白血球数、好中球数が高値を示した。雌の哺育5日の検査では300 mg/kg群で血小板数が低値を示した。雌の回復期間終了時では、300 mg/kg群でヘモグロビン量が高値を示したが、軽度な変化であり毒性学的意義は低いと考えられた。

血液凝固能検査では、雌雄のいずれの時期にも被験物

質投与に起因すると考えられる変化は認められなかつた。

血液生化学検査において、雄の投与期間終了時および雌の哺育5日に300 mg/kg群で総蛋白が低値傾向を示し、雌の哺育5日の検査において全ての投与群でコリンエステラーゼが低値を示した。また、300 mg/kg群でカリウムが高値を示した。雌の回復期間終了時では、300 mg/kg群でアルカリホスファターゼが高値を示した。

尿検査では、雄の投与期間終了時に100および300 mg/kg群でケトン体陽性例が増加したが、軽度な変化であり被験物質投与との関連は明らかでなかった。

コリンエステラーゼ活性検査では、投与期間終了時に雄の300 mg/kg群および雌の100および300 mg/kg群で脳コリンエステラーゼ活性が低値を示した。

病理学検査では、毒性所見としては100および300 mg/kg群で精巣障害が観察された。精子形成サイクルの観察で100 mg/kg群のプレレプトテン期精母細胞およびパキテン期精母細胞のセルトリ細胞当たりの比率が低値を示した。また、300 mg/kg群の組織像から精巣障害はセルトリ細胞障害に起因した変化であることが想定された。この変化は、300 mg/kg群の回復期間終了時においてより著明であることから遅延性あるいは進行性病変と考えられる。

器官重量では300 mg/kg群の精巣や精巣上体重量が低下し、雄の投与期間終了時に胸腺重量が100および300 mg/kg群で高値を示した。また、哺育5日の雌の300 mg/kg群で心臓および腎臓重量が高値を示した。

病理学検査で認められた精巣毒性および臨床検査の一部で回復性は確認できなかつたが、その他の変化は回復していた。

2. 生殖発生毒性

平均性周期および交尾能に被験物質投与の影響は認められなかつた。300 mg/kg群で妊娠不成立と判定された雄2例には病理組織学検査で精巣毒性が観察され、これらの変化が妊娠を成立させなかつた原因であると推察された。分娩時観察では、分娩状態の異常はいずれの投与群でも認められなかつた。新生児の外表検査および哺育4日の剖検では異常は認められなかつた。300 mg/kg群で出生児の哺育4日の体重増加が抑制され、雌新生児の4日の生存率にも有意な低値が認められ、被験物質投与による出生児の発育阻害が示唆された。その他、妊娠期間、妊娠黄体数および着床数に被験物質投与の影響は認められず、出産児数、出産生児数、性比および出産率に

も影響は認められなかった。

以上のことから、*O,O'*-ジエチルジチオリン酸の本試験条件下における無影響量(NOEL)は雌雄ともに30 mg/kg/day未満と判断された。

生殖能に及ぼす影響は100および300 mg/kg/day投与で精巣毒性が認められたことから雄の無影響量は30 mg/kg/day、雌は300 mg/kg/day投与でも影響は認められず300 mg/kg/dayと判断された。児動物の発生・発育に及ぼす影響は300 mg/kg/day投与で雌の生後4日生存率の有意な低値および哺育4日の体重増加抑制が認められ、無影響量は100 mg/kg/dayと判断された。

方法

1. 被験物質

O,O'-ジエチルジチオリン酸(和光純薬工業製造、Lot No. ASK5069、含量98.9 wt%，分子量186.24)は暗青色の液体であり、使用時まで被験物質保管庫(冷暗所)に保存した。残余被験物質を製造元で再分析することにより、本ロットが投与期間中安定であったことを確認した。被験物質は1.0 vol% Tween 80を含む0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)水溶液(CMC-Na:和光純薬工業、注射用水:光製薬、Tween 80:ナカライトスク)に懸濁し、6, 20および60 mg/mLの投与液を調製した。投与液は投与まで冷暗所に保存し、調製後7日以内に使用した。被験物質の1.0 vol% Tween 80を含む0.5 w/v% CMC-Na水溶液での安定性は、1および200 mg/mLの濃度について7日間冷蔵保存後室温放置24時間は安定であることを確認した。

投与液の濃度/均一性分析は、初回および最終調製時に調製した全ての試験群の投与液について行った。その結果、基準範囲内(設定濃度の±15 %以内、変動係数10 %以下)であった。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバーから購入した生後8週齢のSprague-Dawley(Crj:CD(SD)IGS, SPF)系雄ラット48匹および雌ラット58匹を使用した。購入した動物は7日間検疫・馴化飼育した後、8日間の予備飼育をし、体重推移および一般状態に異常が認められなかつたものを10週齢で群分けして試験に用いた。群分け時の体重は、雄で317～385 g、雌で208～247 gの範囲であった。

動物は、温度24 ± 3°C、湿度55 ± 20 %、換気回数15回/時間、照度150～300 lux、照明時間12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)に管理されたパリアシステムの飼育室でアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに1匹ずつ収容し飼育した。妊娠18日以降の母動物は哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに哺育トレーおよび巣作り材料(サンフレーク、日本チャールス・リバー製造)を入れて飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母製造のCRF-1固型飼料(放

射線滅菌飼料)を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水を自由に摂取させた。

3. 群分け

動物は投与開始日の体重をもとに層別化し、無作為抽出法により雄は1群当たり各12匹、雌は対照群および高用量群に各17匹、低および中用量群に各12匹を振り分けた。雌雄ともに毒性試験群として1群当たり12匹を配し、雄は投与終了後、対照群と高用量群の各5匹を選抜して回復性試験群に用いた。雌は毒性試験群の動物とは別に回復性試験群として対照群と高用量群に各5匹を配した。なお、雌は群分け前に8日間の性周期観察を行い、正常な性周期を有する動物を群分けに用いた。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

MSDSに記載されている本被験物質のラットにおける急性経口毒性の結果(LD_{50} :4510 mg/kg)を参考にして、0, 30, 100, 300および1000 mg/kgの用量で2週間投与予備試験を実施した。その結果、1000 mg/kg群では雄の5/5例および雌の2/5例が死亡した(雄の切迫解剖1例含む)。また、一般状態の変化として、雌雄に流涎、被毛の汚れ、耳介および四肢の蒼白、体温低下、散瞳、眼瞼下垂、眼球貧血および自発運動低下が観察された。雌雄ともに体重の増加抑制および摂餌量の低下が認められた。血液学検査では、雌の生存例で赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度およびリンパ球比率が低値を、血小板数および好中球比率が高値を示した。また、網赤血球率が高値傾向を示した。血液生化学検査では、雌の生存例で総コレステロール、総ビリルビン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ、カルシウム、無機リンおよびカリウムが高値または高値傾向を示し、総蛋白、アルブミン、A/G、アルカリ fosファターゼおよび塩素が低値を示した。器官重量では、雌の生存例で肝臓重量の高値および胸腺重量の低値が認められた。病理学検査では、被験物質投与の影響が疑われる所見として雌の生存例に削瘦、腺胃の潰瘍あるいは白色斑/区域および前胃の肥厚が観察された。300 mg/kg群では、一般状態の変化として、雌雄に流涎が観察された。雄に体重の増加抑制が認められた。血液学検査では、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値が雄で低値傾向を、雌で低値を示した。また、網赤血球率が雄で高値を、雌で高値傾向を示した。血液生化学検査では、雌雄の総コレステロールが高値を示し、総蛋白が低値を示した。また、雄のアルブミンおよび尿素窒素の低値、雌の総ビリルビンが高値を示した。したがって、本試験では明らかな毒性徵候が現れることが予想され、長期の投与期間でも死亡動物が多発しないと考えられる300 mg/kg/dayを高用量とし、以下公比約3で除し、100および30 mg/kg/dayを中および低用量に設定した。

投与液量は、体重100 g当たり0.5 mLとし、交配前および交配期間ならびに交配期間終了後の投与期間の雌雄

では、個体別に測定した最新体重に基づいて算出した。また、妊娠期間および哺育期間中の雌は、妊娠0, 7, 14, 20および哺育0日に測定した個体別体重に基づいて算出した。投与液は、胃ゾンデを用いて1日1回強制経口投与した。対照群には1.0 vol% Tween 80を含む0.5 w/v% CMC-Na水溶液のみを投与した。

投与期間は、雄は交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後14日間の連続42日間とした。雌は交配前14日間と交配期間中(最長4日間)および交尾した雌は妊娠期間を通じて分娩後の哺育4日まで(42~46日間)とした。また、交尾後分娩しない雌は妊娠25日の解剖前日まで(40日間)とした。雌の回復性試験用動物は雄と同じ連続42日間とした。

5. 観察および検査

1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日2回以上(回復期間中および剖検日は1回)を行い、異常および死亡の有無を記録した。

2) 体重

雄は投与1(投与開始日), 8, 15, 22, 29, 36, 42および43日(剖検日あるいは回復1日)に測定し、投与1から42日までの体重増加量を算出した。回復試験群の雄は、投与終了後回復1, 8, 14および15日(剖検日)に測定し、回復1から14日までの体重増加量を算出した。

雌は投与1(投与開始日), 8および15日に測定し、投与1から15日までの体重増加量を算出した。また、交尾後の雌は、妊娠0, 7, 14および20日に、分娩した雌は分娩後0, 4および5日(剖検日)に測定し、それぞれ妊娠0から20日および分娩後0から4日までの体重増加量を算出した。回復試験群の雌は、回復試験群の雄と同日に測定し、投与1から42日および回復1から14日までの体重増加量を算出した。

3) 摂餌量

雄は投与1(投与開始日), 8, 15, 22, 29, 36および42日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与22から42日までの累積摂餌量を算出した。回復試験群の雄は、投与終了後回復1, 8および14日(剖検前日)に測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに回復1から14日までの累積摂餌量を算出した。

雌は投与1(投与開始日), 8および15日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾した雌は妊娠0, 7, 14および20日に、分娩した雌は分娩後0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに妊娠0から20日までの累積摂餌量を算出した。回復試験群の雌は、回復試験群の雄と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日

までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から42日および回復1から14日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の同居動物は摂餌量を測定しなかった。

4) 機能観察総合検査(FOB)

機能観察総合検査は全生存動物について行った。検査は、投与期間中は投与30分後から開始した。以下の機能観察総合検査の内、詳細な症状観察は群分け前に1回、投与開始後は週1回行った(回復期間を含む)。ただし、交尾した雌は妊娠7および14日、分娩した雌は哺育4日に行った。種々の刺激に対する運動感覚反応の観察、握力測定および自発運動量測定は、雄は各群5例(対照群および高用量群は回復試験群の5例、低および中用量群は動物番号の若い順に5例)について投与42日および回復14日に行った。雌は動物番号の若い順に各群5例について分娩後4日に行なった。回復試験群の雌は投与42日および回復14日を行なった。群分け前の詳細な症状観察は、仮動物番号の若い順に実施した。投与期間中の検査は、群により検査の時間帯が偏らないよう配慮して行った。

a) 詳細な症状観察

詳細な症状観察では、ケージ内の姿勢について観察し、身悶え、旋回、咬み行動、痙攣および異常発声の有無を確認し、記録した。また、ケージ外へ動物を取り出し、出し易さ、扱い易さ、異常発声、筋緊張、立毛、被毛の状態、眼瞼状態、咬傷、流涙、流涎、呼吸、眼球、可視粘膜、尿失禁およびカタレプシーについて観察し、記録した。さらにオープンフィールド装置の中央で30 cmの高さからの空中正向反射を観察し、動物が着地した時点から3分間オープンフィールド内での動物の呼吸、協調運動、痙攣、毛繕い、歩行、歩行異常、眼瞼状態、常同行動、異常行動、異常発声、覚醒度および移動量について観察し、立ち上がり回数、脱糞回数および排尿回数を数え、記録した。

b) 種々の刺激に対する運動感覚反応の観察

瞳孔反射、接近反応、触覚反応、聴覚反応および痛覚反応を検査し、記録した。

c) 握力(前後肢)

前後肢の握力についてはデジタルラップシュプルゲージ(アイコーエンジニアリング)を用いてそれぞれ2回測定し、平均値を記録した。

d) 自発運動量測定

CAS(東洋産業)を用いて個別に測定した。上記a)からc)項の検査終了後(投与後約40分)に測定を開始した。データの収集間隔は1分毎とし、集計時間は10分毎の1時間とした。測定環境は、照明を点灯状態、測定室の騒音レベルはホワイトノイズ発生装置PA-1(永島医科器械)でおよそ70 dBに保ち、普通騒音計NA20(RION)を用いて測定し、記録した。

5) 交配

交配は交配前14日間の性周期観察を行なった雌と同群内の雄を1対1で最長4日毎晩同居させた。交尾の確認

は、同居させた翌朝、陰栓または陰垢中の精子確認により行い、交尾が確認された雌はその日を妊娠0日とした。雌が死亡したために交配の組み合せができなかった雄については、交配させることなく、そのまま投与を続け、他の雄と同様に扱った。性周期観察は交尾確認日まで行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した。また、性周期観察期間中の異常性周期(4または5日以外の性周期)発現率[(異常性周期を示す雌動物数/観察雌動物数)×100]を算出した。交配結果から各群について交尾率[(交尾動物数/同居動物数)×100]を算出した。なお、回復試験群の雌は、性周期観察および交配を実施しなかった。

6) 自然分娩時および新生児の観察

妊娠動物は全て自然分娩させた。自然分娩時に分娩状態の観察を行った。分娩の確認を妊娠20から25日の午前8時30分～10時の間に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物および分娩を開始した動物は分娩完了まで待ち、その日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩を開始した場合は翌日を哺育0日とした。また、妊娠期間(哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数)、受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×100]、出産率[(生児出産雌数/妊娠雌数)×100]、着床率[(着床痕数/妊娠黄体数)×100]、分娩率[(総出産児数/着床痕数)×100]、出生率[(出産生児数/総出産児数)×100]を算出した。妊娠25日の午前9時までに分娩のみられない動物は病理剖剖し、着床痕の認められない場合、妊娠不成立と判定した。哺育5日に母動物は病理剖剖し、黄体数および着床痕数を調べ肉眼的に異常の有無を調べた。

新生児については哺育0日に出産児数(生存児+死亡児)を調べ、性別を判定し、性比(雄/雌)を算出するとともに、外表異常の有無を調べた。また、哺育0および4日に雌雄個体別の体重を測定し、1腹の雌雄別平均体重を算出した。哺育4日の体重測定後、エーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った。哺育期間中の死亡児はブアン液に固定し、器官・組織の肉眼観察を実施した。また、新生児の4日の生存率[(哺育4日生児数/出産生児数)×100]を算出した。

7) 臨床検査

血液学検査、血液凝固能検査および血液生化学検査は雄および自然分娩した雌の剖検時(雄:投与43日、雌:哺育5日)に各群の動物番号の若い順に5例、雌雄の回復試験群の剖検時(回復15日)に全例について実施した。採血するに当たり、動物を約16時間絶食させた。

動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

a) 血液学検査

抗凝固剤(EDTA-2 K)入り採血管インセパック-E(積水化学工業)に新鮮血を採取し、総合血液学検査装置ADVIA120(バイエル)を用いて白血球数(WBC:フローサイトメトリー)、赤血球数(RBC:暗視野板法)、ヘモ-

グロビン量(HGB:シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(HCT:RBC、MCVより算出)、平均赤血球容積(MCV:暗視野板法)、平均赤血球血色素量(MCH:HGB、RBCより算出)、平均赤血球色素濃度(MCHC:HGB、HCTより算出)、血小板数(PLT:暗視野板法)、白血球百分率(フローサイトメトリー)および網赤血球率(Reticulocyte:RNA染色法)を測定した。

白血球百分率は前述の機器で測定したが、別途血液塗抹標本を作製し、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色して保存した。

b) 血液凝固能検査

抗凝固剤(3.13%クエン酸ナトリウム水溶液)入り採血管ペノジエクトII(テルモ)に血液を採取した後、3000 r.p.m.で13分間遠心分離して得た血漿を検査に用いた。全自动血液凝固線溶測定装置STA Compact(ロシュ)を用いてプロトロンビン時間(PT:粘度変化検知方式)および活性化部分トロンボプラスチック時間(APTT:粘度変化検知方式)を測定した。

c) 血液生化学検査

採血管インセパックSQ(積水化学工業)に血液を採取した後、3000 r.p.m.で7分間遠心分離して得た血清を検査に用いた。多項目生化学自動分析装置日立7170(日立製作所)を用いて総蛋白(T. protein:Biuret法)、アルブミン(Albumin:BCG法)、A/G(計算値)、血糖(Glucose:HK-G-6-PDH法)、中性脂肪(Triglyceride:GK-GPO遊離グリセロール消去法)、総コレステロール(T. cholesterol:コレステロールオキシダーゼHDAOS法)、尿素窒素(BUN:ウレアーゼGLDH法)、クレアチニン(Creatinine:酵素法)、総ビリルビン(T. bilirubin:バナジン酸酸化法)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST:酵素-UV法)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT:酵素-UV法)、アルカリホスファターゼ(ALP:P-ニトロフェニルリン酸基質法)、コリンエステラーゼ(ChE:ヨウ化ブチリルチオコリン基質法)、 γ -グルタミルトランスペチダーゼ(Gamma-GTP:L- γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-NA法)、カルシウム(Calcium:MXE法)、無機リン(I. phosphorus:PNP-XDH法)および総胆汁酸(T. bile acid:酵素サイクリング法)を、電解質測定装置EA06R(エイアンドティー)を用いてナトリウム(Sodium:イオン選択電極法)、カリウム(Potassium:イオン選択電極法)および塩素(Chloride:イオン選択電極法)を測定した。

d) 尿検査

投与期間終了週に、各群それぞれ5例の雄動物について検査を行った。

給餌・給水の条件下で採尿ケージを用いて3時間尿(午前10時から午後1時まで)および24時間尿(午前10時から翌日午前10時まで)を採取した。

3時間尿を用いてpH、潜血、糖、蛋白、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンを検査した。検査にはN-マルティスティックスSG(バイエルメディカル)を用い、判定は尿分析装置CLINITEK500(バイエル)で行った。

24時間尿を用いて尿量(計量)および色調(目視)を検査した後、尿を室温、1500 r.p.m.で5分間遠心し、上清および残渣に分離した。上清を用いて上述の電解質測定装置EA06Rでナトリウム、カリウムおよび塩素を測定した。さらに尿量を用いてナトリウム、カリウムおよび塩素の総排泄量を算出した。また、Auto & stat OM-6030(アークリファクトリー)で尿浸透圧(冰点下降法)を測定した。

e) コリンエステラーゼ活性検査

臨床検査を実施する動物全例の脳のコリンエステラーゼ(ChE)活性を測定した。解剖時に脳重量を測定した後、脳の左半分を採取して重量を測定し記録した。重量測定後、脳の左半分は約-80℃で保存し、コリンエステラーゼ活性を測定した。測定は、テクニコンAA II(テクニコン)を用いてヨウ化アセチルチオコリンを基質とするDTNB法で行った。

8) 病理学検査

a) 剖検および器官重量

解剖では動物の外観、口腔、鼻孔および頭蓋腔、骨格、脳および脊髄の外観と切断面、胸腔、腹腔および骨盤腔とその内臓、頸部の組織および器官を検査した。生殖器官については、特に注意を払い検査した。全ての肉眼的異常にについて、部位、大きさ、硬さなどを記録した。また、解剖した全ての動物について皮膚、乳腺、リンパ節(腸間膜、下顎)、唾液腺(舌下腺、下顎腺)、胸骨、大腿骨、骨髓(胸骨、大腿骨)、胸腺、気管、肺(気管支を含む:左側注入固定)、心臓、甲状腺、上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、腫、眼球(視神経を含む)、ハーダー腺、脳(大脳、小脳、橋を含む:コリンエステラーゼ活性測定動物は右半分のみ固定)、下垂体、脊髄(頸部、胸部、腰部)、坐骨神経および肉眼で異常病変が認められた器官・組織を10 vol%中性緩衝ホルマリン液に、精巣および精巣上体をブアン液で前固定した後、10 vol%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

重量を測定した器官については、器官重量/体重比(相対重量)を剖検日の体重および器官重量から算出した[(器官重量/剖検日の体重)×100]。なお、コリンエステラーゼ活性検査のため、脳の重量測定を最初に実施した。

① 死亡動物(300 mg/kg群の雌6例)および瀕死動物(300 mg/kg群の雌2例)

死亡動物は発見後解剖まで冷蔵庫に保存し、人工的変化を防止するため、凍結しないようにした。瀕死動物はエーテル麻酔下で採血後、放血安楽死させ解剖した。交尾確認後に死亡した300 mg/kg群の雌4例の内、子宮内を調べ着床が認められなかった2例については妊娠不成立と判定した。なお、妊娠1日に相当する日に死亡した1例は妊娠判定が不可能であったため、この動物の妊娠期間のデータは集計に含めなかった。

② 雄動物

42日間投与した翌日にエーテル麻酔下で採血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、唾液腺、甲状腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体重量を測定した。甲状腺は固定後測定した。

③ 自然分娩した雌

哺育4日まで投与した翌日にエーテル麻酔下で採血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、唾液腺、甲状腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および卵巣重量を測定した。なお、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

④ 自然分娩の認められない雌(30 mg/kg群の1例)

妊娠25日に相当する日に、エーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った。子宮内を調べ、着床痕が認められなかつたため妊娠不成立と判定した。

⑤ 回復試験群の雄

回復14日の翌日にエーテル麻酔下で採血後、放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、唾液腺、甲状腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体重量を測定した。甲状腺は固定後測定した。

⑥ 回復試験群の雌

回復14日の翌日にエーテル麻酔下で採血後、放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、唾液腺、甲状腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および卵巣重量を測定した。甲状腺は固定後測定した。

b) 病理組織学検査

下記に該当する動物について病理組織学検査を実施した。

組織は常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリノ・エオジン染色した。鏡検では病変の種類、程度について記録した。

なお、精巣についてはPAS・ヘマトキシリノ染色およびヘマトキシリノ・エオジン染色した後、ヘマトキシリノ・エオジン染色標本で一般的な病変を検査し、②、④および⑤についてはPAS・ヘマトキシリノ染色標本で精子形成サイクル(VIまたはVII)を検査した¹⁾。

① 死亡動物(300 mg/kg群の雌6例)および瀕死動物(300 mg/kg群の雌2例)

全固定器官について実施した。

② 妊娠を成立させた雄

対照群と高用量群の各5例の全固定器官、および全群の剖検時に認められたそれ以外の異常病変部組織について実施した。

③ 自然分娩した雌

対照群と高用量群の各5例の全固定器官、および全群の剖検時に認められたそれ以外の異常病変部組織について実施した。

④ 妊娠を成立させなかつた雄および妊娠不成立の雌

雄は唾液腺、精巣、精巣上体、精囊および前立腺、および異常病変部組織、雌は唾液腺、腫、子宮および卵巣について実施した。

⑤ 回復試験群の雌雄

全固定器官について実施した。

また、②については高用量群の胃、精巣および精巣上体に被験物質投与の影響が疑われたため、これらの器官については低および中用量群も各5例ずつ検査を実施した。③については高用量群の胃に被験物質投与の影響が疑われたため、低および中用量群も胃を各5例ずつ検査を実施した。

6. 統計解析

体重、体重増加量、摂餌量、累積摂餌量、平均性周期、黄体数、着床痕数、妊娠期間、出産児数、死産児数、性比、着床率、出生率、分娩率、外表異常発現率、新生児の4日の生存率、FOB検査値(握力、自発運動量、立ち上がり回数、脱糞回数、排尿回数)、血液学検査値、血液凝固能検査値、血液生化学検査値、コリンエステラーゼ活性検査値、尿検査値(尿量および尿浸透圧)、器官重量および相対重量については自動判別方式に従い、最初に Bartlett の等分散検定²⁾を実施した。等分散の場合は Dunnett の多重比較検定³⁾で対照群と各投与群間の有意差を検定した。Bartlett の等分散検定で不等分散の場合は Steel の検定⁴⁾で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

出産率、交尾率および受胎率については χ^2 検定を用いた。

異常性周期発現率、立ち上がり、脱糞および排尿を除く詳細な症状観察ならびに種々の刺激に対する運動感覚反応の観察の各項目、剖検所見および病理組織所見の発生率については Fisher の直接確率検定法⁵⁾で検定した。病理組織所見のうち程度の増強が認められた所見は一(マイナス)を「1」、+1を「2」、+2を「3」、+3を「4」に割り当てて Mann-Whitney の U 検定を実施した。精子形成サイクルのセルトリ細胞当たりの各ステージの細胞比率についても Mann-Whitney の U 検定を実施した。

一般状態の所見についての統計解析は行わなかった。

有意水準は Bartlett の等分散検定については 5 %、他の検定は 5 % および 1 % の両側検定で実施した。ただし、供試動物数が 1 群につき 2 例以下の場合、有意差検定は行わなかった。

なお、哺育期間中の出生児に関する成績は 1 母体当たりの平均を 1 標本として集計した。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

投与期間中に雌の 300 mg/kg 群で 6 例が死亡し、2 例が瀕死状態になったため切迫解剖した。これら動物の死亡は、投与 5, 12 および 20 日に各 1 例、妊娠 1 および 12 日に各 1 例、哺育 0 日に 1 例認められた。また、切迫解剖動物は、妊娠 13 日に 2 例認められた。雄には死亡例は観察されなかった。

一般状態の変化として、雄では投与後 30~60 分に流

涎が 30, 100 および 300 mg/kg 群でそれぞれ 2, 10 および 9 例に観察された。また、軟便が 30 および 300 mg/kg 群でそれぞれ 1 および 3 例に観察された。その他、外傷が対照群の 1 例、眼分泌物が対照群および 300 mg/kg 群で各 1 例に観察された。300 mg/kg 群の回復試験群においても投与期間中に流涎および軟便が観察されたが、回復期間中には一般状態の変化は認められなかった。

雌では投与期間を通じて投与後 30~60 分に流涎が 30, 100 および 300 mg/kg 群でそれぞれ 2, 8 および 7 例に観察された。死亡例の内 3 例は死亡前に著明な一般状態の変化は観察されなかっただが、他の死亡例および切迫解剖例には削瘦、立毛、被毛の汚れ、蒼白、眼瞼下垂、体温低下、腹部膨満、軟便、水様便、異常呼吸音、呼吸促迫、および呼吸困難等の全身状態の悪化を示す症状が認められた。異常呼吸音は、生存例の 3 例(回復試験群の 1 例を含む)にも単発性に認められた。その他、眼分泌物が対照群で 1 例、軟便が 30 mg/kg 群で 1 例、流涙および歯異常が 100 mg/kg 群で各 1 例に観察された。300 mg/kg 群の回復試験群においても投与期間中に流涎、異常呼吸音、体温低下および呼吸困難が観察されたが、回復期間中には一般状態の変化は認められなかっただ。

2) 体重(Fig. 1-4)

雄では、対照群に比べ 300 mg/kg 群で投与 15 日以降投与期間終了時まで低値傾向が認められ、投与 1 から 42 日の体重増加量も低値傾向を示した。300 mg/kg 群の回復試験群においても投与期間中の体重増加量は低値傾向を示し、回復期間でも対照群に比べ体重が低値で推移したが、体重増加量には差は認められなかっただ。

雌では、対照群に比べ 300 mg/kg 群で投与 8 および 15 日に低値傾向が認められ、投与 1 から 15 日の体重増加量も統計学的に有意な低値を示した。妊娠期間および哺育期間では対照群と被験物質投与各群との間に統計学的に有意な差は認められなかっただ。300 mg/kg 群の回復試験群においても投与期間中の体重増加量は低値傾向を示し、回復期間でも対照群に比べ体重が低値で推移したが、体重増加量には差は認められなかっただ。

3) 摂餌量(Fig. 5-8)

雌雄ともに、投与期間および回復期間を通じて対照群と被験物質投与各群との間に統計学的な有意差は認められなかっただ。

4) 機能観察総合検査(FOB)

a) 詳細な症状観察および種々の刺激に対する運動感覚反応の観察

詳細な症状観察において、被験物質投与の影響と考えられる変化として、雄では、ケージ外観察において投与期間の後半に流涎なしの動物数が 100 および 300 mg/kg 群で有意に減少し、逆に軽度の流涎を示す動物数が有意に増加した。その他、有意な発生数の増減を示した所見が認められたが、用量に関連しない、一貫した変化ではない、あるいは対照群の値が偶発的に高かったことに起

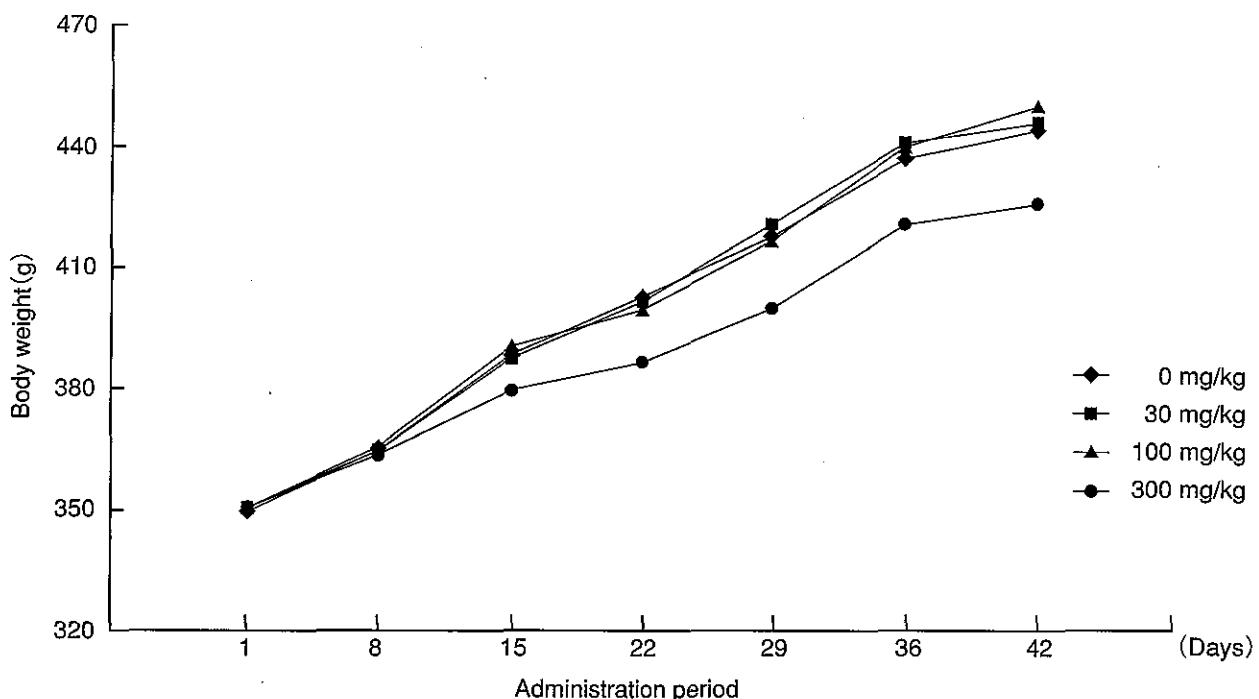


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Reprotox study)

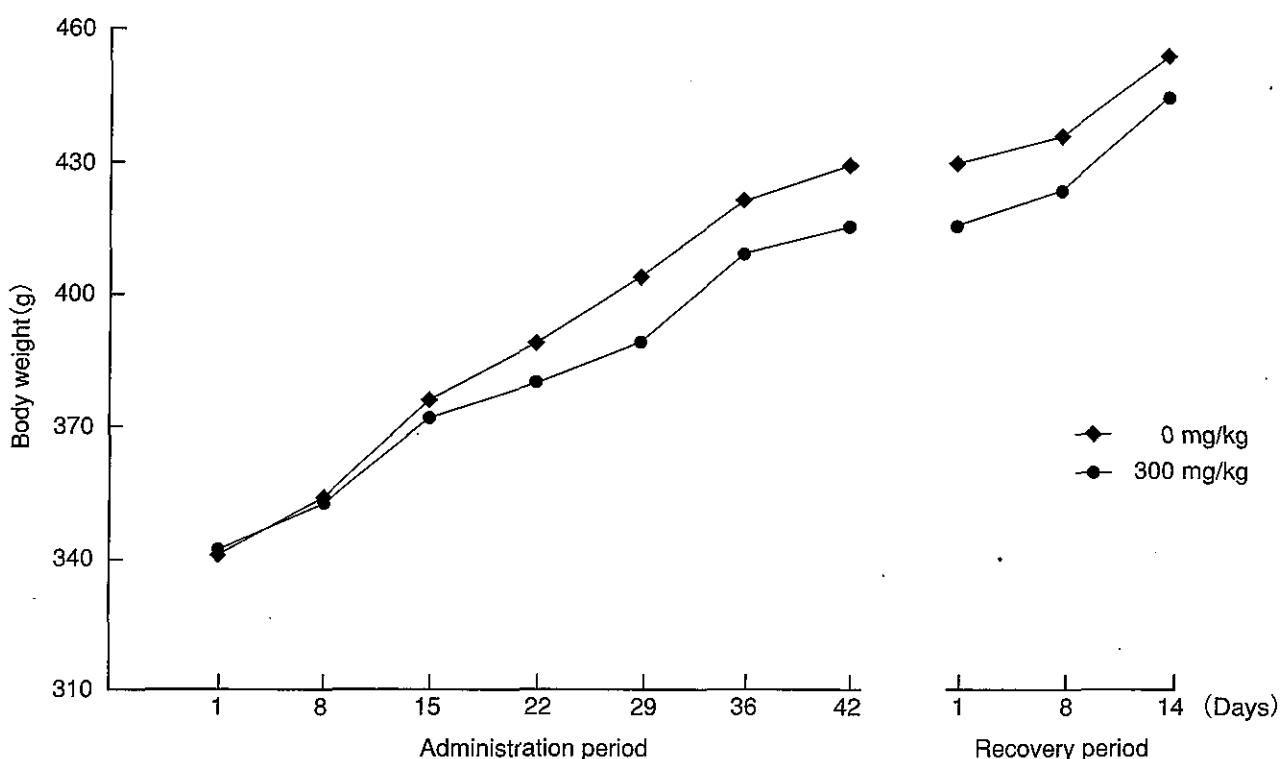


Fig. 2 Body weight change of male rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Recovery study)

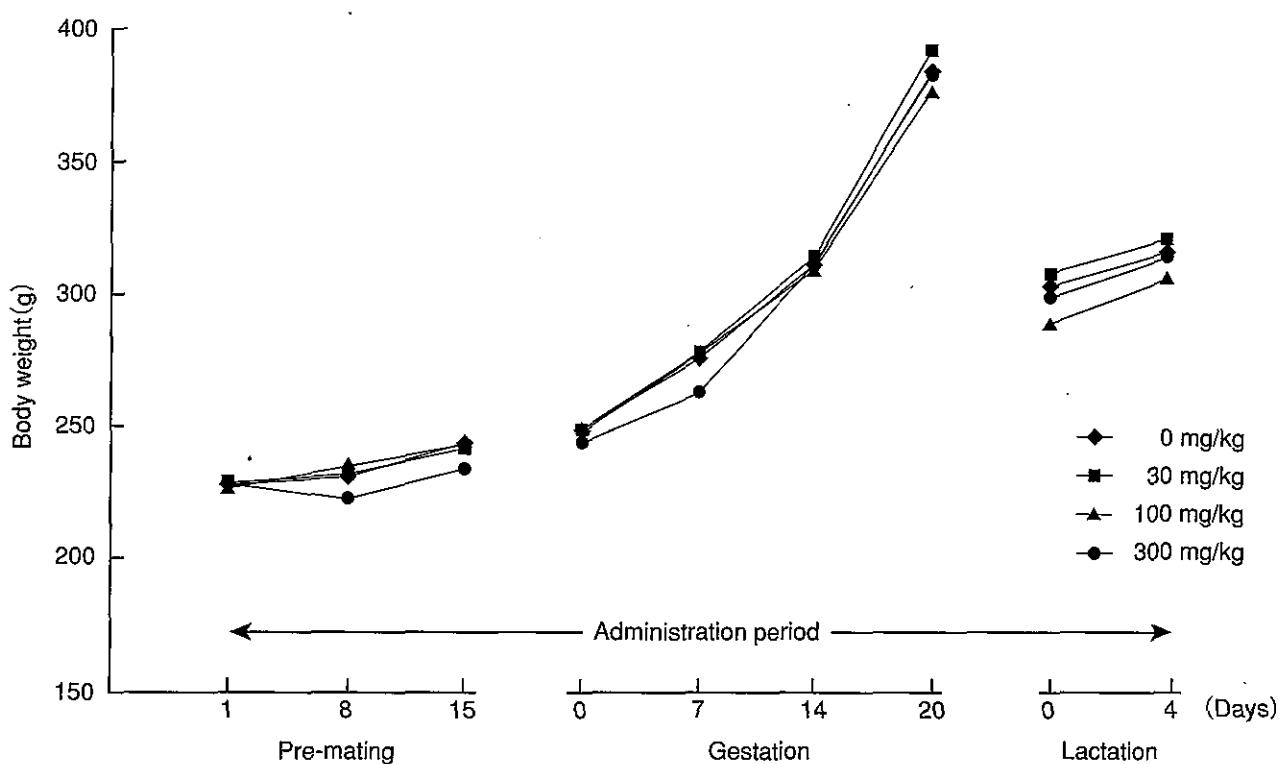


Fig. 3 Body weight change of female rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Reprotox study)

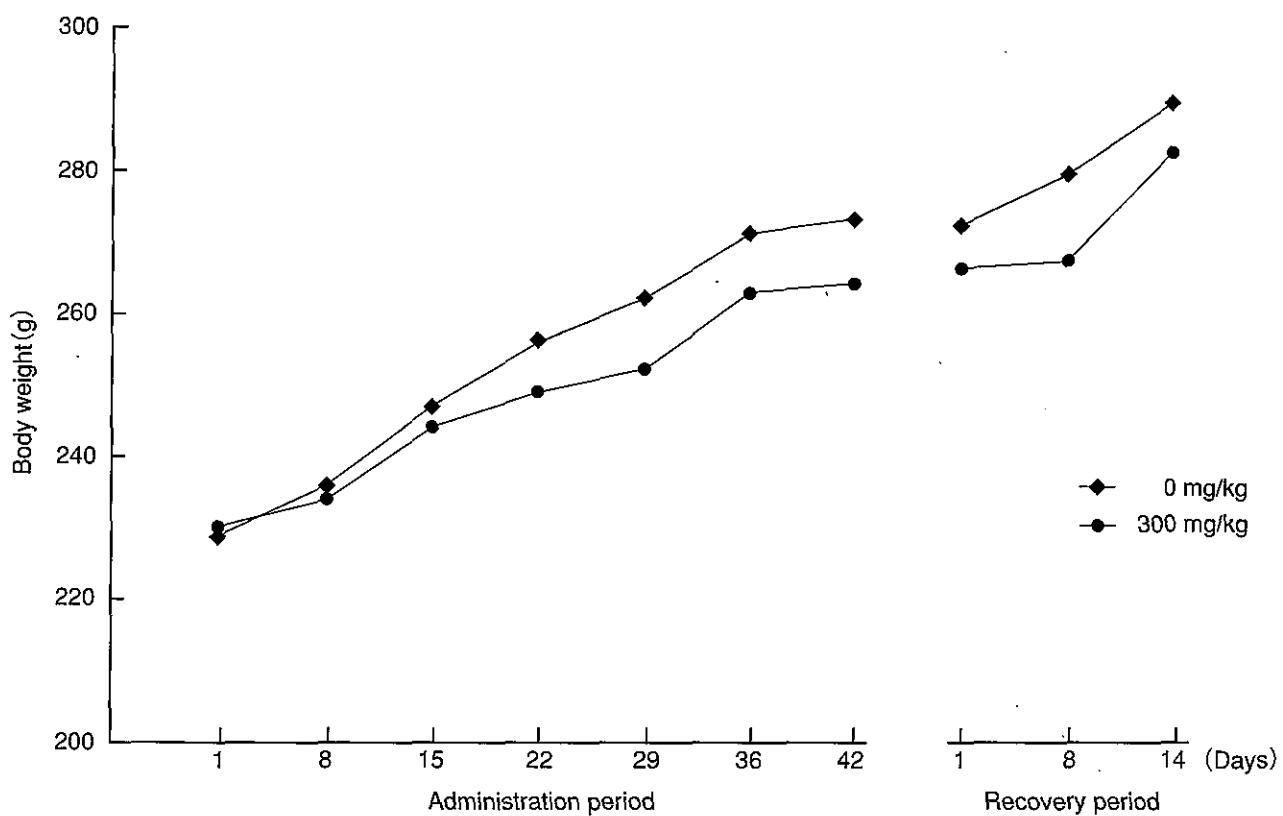


Fig. 4 Body weight change of male rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Recovery study)

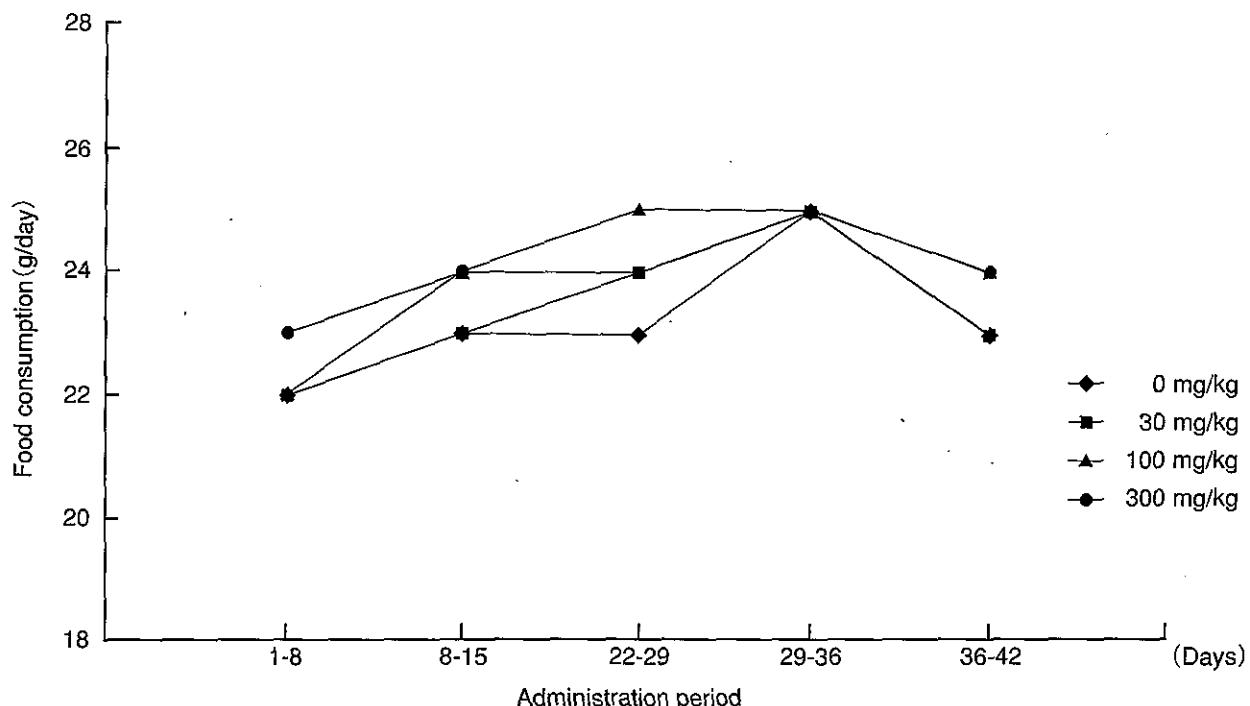


Fig. 5 Food consumption of male rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (ReproTox study)

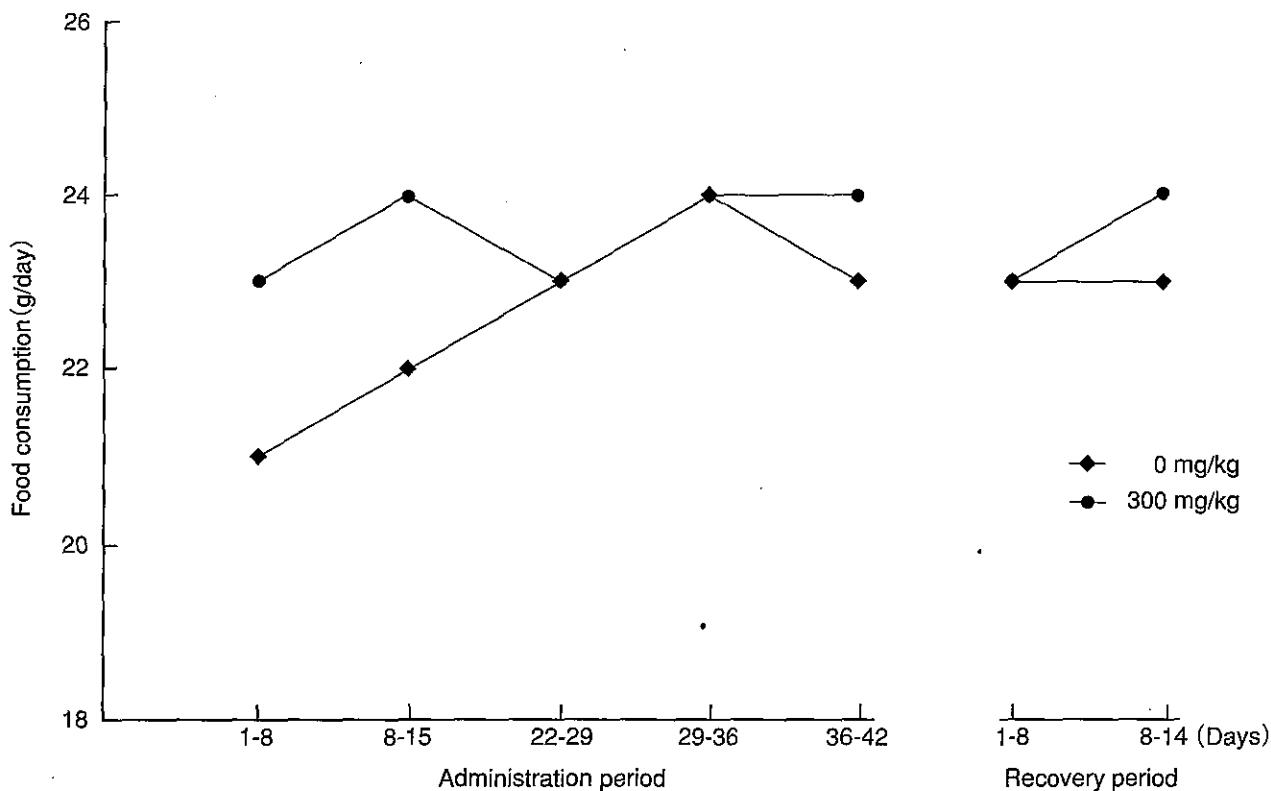


Fig. 6 Food consumption of male rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Recovery study)

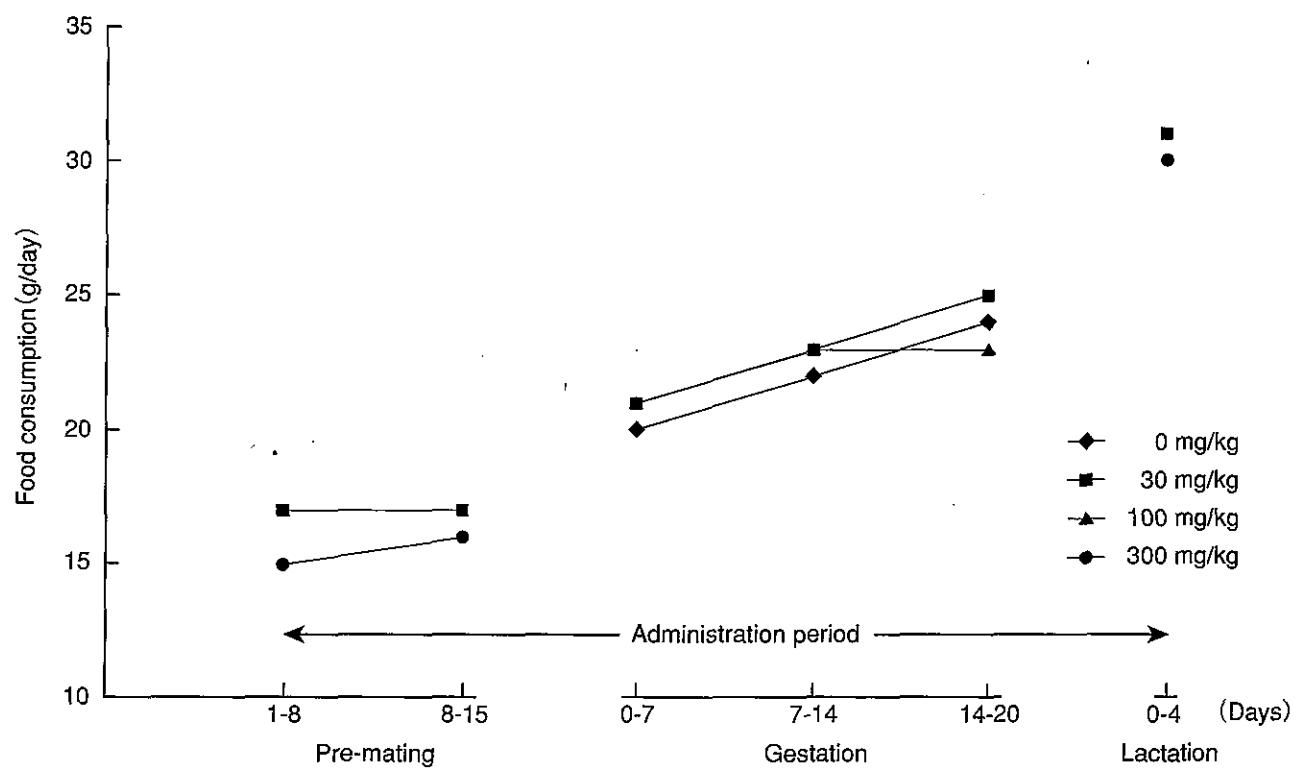


Fig. 7 Food consumption of female rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Reprotox study)

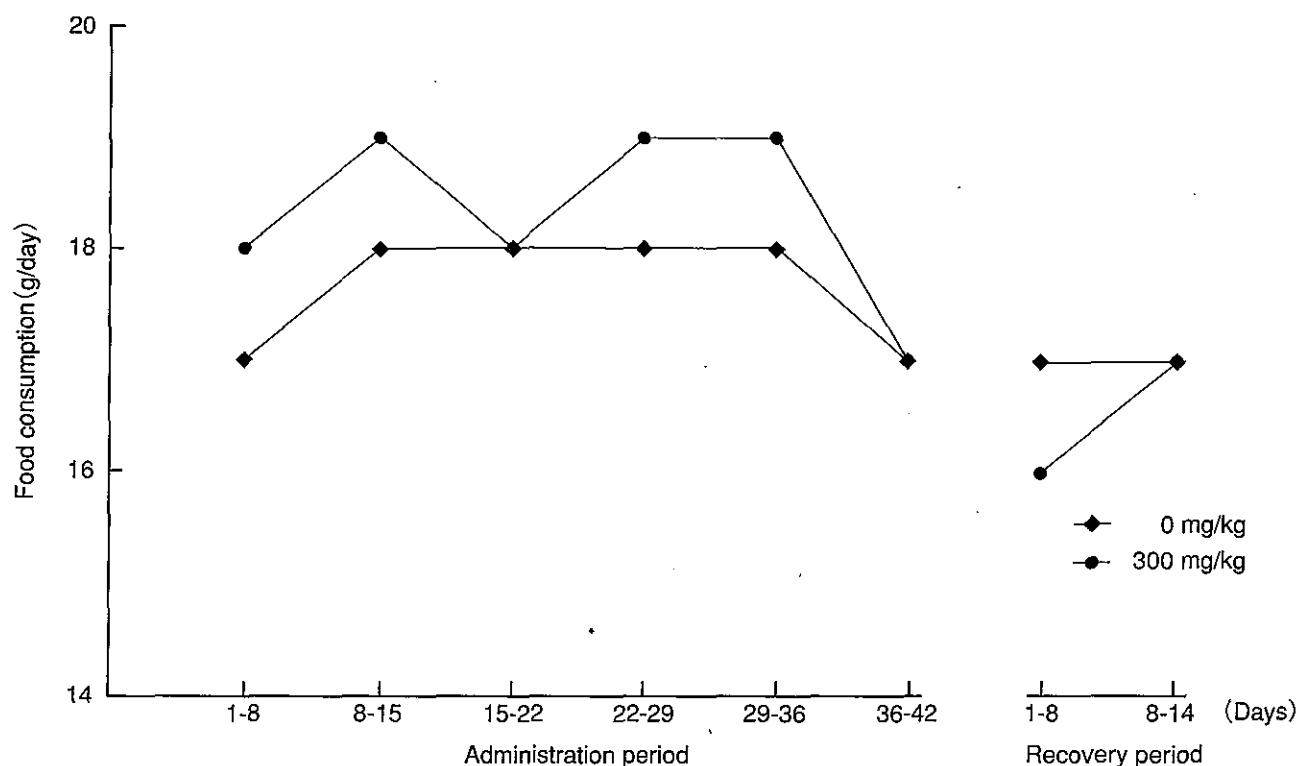


Fig. 8 Food consumption of female rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Recovery study)

因した変化であった。回復期間では、上記軽度の流涎を示す動物は認められなかった。

雌では、ケージ外観察において妊娠7日に軽度の流涎を示す動物数が100 mg/kg群で有意に増加した。また、オープンフィールド内の観察において300 mg/kg群で投与10日に移動量の軽度な減少を示す動物数が有意に増加した。その他、有意な発生数の増減を示した所見が認められたが、用量に関連しない、あるいは毒性学的に意義のない変化であった。回復試験群では、被験物質投与群に関係すると考えられる変化は認められなかった。

種々の刺激に対する運動感覚反応の観察では、雌雄ともに被験物質投与の影響と考えられる反応の変化は認められなかった。

b) 握力(前後肢)

雄の投与期間終了時および回復期間終了時、雌の投与期間終了時および回復期間終了時ならびに哺育4日のいずれにおいても対照群と被験物質投与各群との間で前肢および後肢の握力に差はみられなかった。

c) 自発運動量

雄では、回復期間終了時の300 mg/kg群で測定開始後20~30分の自発運動量が対照群に比較して有意な高値を示したが、一過性の変化であり、投与期間終了時の同群には変化が認められなかった。

雌では300 mg/kg群で哺育4日の測定開始後10~20分および測定1時間の総計の自発運動量がそれぞれ有意な低値を示し、投与期間終了時の測定開始後0~10分および10~20分の自発運動量がそれぞれ有意な低値を示した。回復期間終了時の同群には変化は認められなかった。

5) 血液学検査(Table 1)

雄の血液学検査では、投与期間終了時に対照群に比べ300 mg/kg群でヘモグロビン量および赤血球数が統計学的に有意な低値を示した。また、30 mg/kg群で好中球比率が有意な低値、リンパ球比率が有意な高値を示したが、用量に対応しない変化であった。回復期間終了時では、300 mg/kg群で白血球数、好中球数が有意な高値を示した。また、同群で好酸球数が有意な高値を示したが、軽微な変化であった。

雌の血液学検査では、哺育5日に対照群に比べ300 mg/kg群で血小板数が有意な低値を示した。回復期間終了時では、300 mg/kg群でヘモグロビン量が有意な高値を示した。

血液凝固能検査では、雌雄ともに投与期間終了時および回復期間終了時でいずれの検査項目にも対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

6) 血液生化学検査(Table 2)

雄では、投与期間終了時に対照群に比べ300 mg/kg群で総蛋白が低値傾向を示した。回復期間終了時では、いずれの検査項目にも対照群と300 mg/kg群との間に差は認められなかった。

雌では、哺育5日に対照群に比べ全ての被験物質投与

群でコリンエステラーゼが統計学的に有意な低値を示した。また、300 mg/kg群でカリウムが有意な高値を示し、総蛋白が雄と同様に低値傾向を示した。さらに、30および300 mg/kg群でクレアチニンが有意な低値を示したが、軽微な変化であった。回復期間終了時では、300 mg/kg群でアルカリホスファターゼが有意な高値を示した。

7) コリンエステラーゼ活性検査

雄では、投与期間終了時および回復期間終了時において、対照群に比べ300 mg/kg群で脳コリンエステラーゼ活性が統計学的に有意な低値を示し、脳コリンエステラーゼ阻害率はそれぞれ14.6および4.6 %であった。

雌では、哺育5日において100および300 mg/kg群で脳コリンエステラーゼ活性が有意な低値を示し、脳コリンエステラーゼ阻害率はそれぞれ13.8および30.3 %であった。回復期間終了時では対照群と300 mg/kg群との間に差は認められなかった。

8) 尿検査

各群のケトン体陽性例の数は、対照群、30、100および300 mg/kg群でそれぞれ2、3、5および5例であり、100および300 mg/kg群でケトン体陽性例が増加した。また、30 mg/kg群の1例が潜血3+を示したが、この例のみの変化であり、100および300 mg/kg群で認められないことから偶発的な変化と考えられた。その他の検査項目に被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

9) 器官重量(Table 3)

雄の投与期間終了時では、胸腺が対照群に比べ100 mg/kg群で実重量、300 mg/kg群で実重量および相対重量が統計学的に有意な高値を示した。さらに300 mg/kg群で肝臓、脾臓および腎臓の相対重量が有意な高値を示し、唾液腺および精巣上体の実重量が有意な低値を示した。その他、100 mg/kg群で脳の実重量が有意な高値を示したが、用量に関連しない変化であった。回復期間終了時では、300 mg/kg群で精巣および精巣上体の実重量および相対重量が有意な低値を示し、心臓の相対重量が高値を示した。

雌では、哺育5日に300 mg/kg群で腎臓の実重量および相対重量が有意な高値を示し、心臓の相対重量が有意な高値を示した。回復期間終了時では、いずれの測定器官にも対照群と300 mg/kg群との間に差は認められなかった。

10) 剖検所見

死亡・切迫解剖した動物は300 mg/kg群の雌のみに認められた。胃から直腸の全長にわたるガスによる内腔拡張が特徴的な肉眼所見であり、被験物質投与による特異的な変化と考えられた。加えて、脾臓および胸腺の萎縮が各4例に認められた。さらに、肺の赤色化および赤色斑/区域や胃の黒色斑/区域が2例、肺気腫が1例に認め

られた他、胸腺の浮腫および赤色斑/区域、皮下の出血および赤色化、腹腔内出血、腎臓の赤色斑/区域、膣の黒色内容物など出血を主体とする循環障害ならびに消化管の内腔拡張に起因する壁の菲薄化も各1例に認められた。これらの所見は少数例の発生とはいえる同週齢の無処置ラットには稀な変化であることから同様に被験物質投与の直接的あるいは間接的影響と考えられた。胃の結節については、漿膜面に存在し周囲組織と色調に違いがない直径1 mm以下の軽微な病変であり被験物質投与に起因する変化とは考えなかった。また、回復試験群の投与

20日で死亡した300 mg/kg群の1例においても同様に肺の赤色斑/区域、胃の黒色斑/区域および皮下の赤色化が認められ、さらに下顎リシバ節の赤色化ならびに肝臓の白色斑/区域を伴っていた。

投与期間終了時の雄の剖検では、妊娠を成立させた300 mg/kg群の1例の精巣に両側性萎縮が認められた。同病変は同週齢の無処置ラットにはほとんど観察されない病変であり、後述する回復期間終了時の同群雄に類似病変が高率にみられていること、ならびにその組織像から被験物質投与の影響と考えられた。被験物質投与群に観察されたその他の所見はいずれも1例のみに発生した限局性の軽度な病変であり、その発生に用量との関連はなかった。

回復期間終了時の雄では300 mg/kg群で精巣萎縮が4例に認められ、有意な発生数の増加を示した。両側性の発生であり、発生数も多いことから被験物質投与の影響と考えられた。精巣および精巣上体以外に観察されたその他の所見は同週齢の無処置ラットにしばしば認められる病変と発生数、程度ならびに形態学的特徴に差がないことから自然発生病変と考えられた。

自然分娩した雌および回復期間終了時の雌に観察された所見は、いずれも対照群のみの発生、1例のみの発生あるいは用量との関連のない発生を示した。

妊娠を成立させなかつた雄の30 mg/kg群の1例および300 mg/kg群の2例では異常所見は認められなかつた。一方、妊娠不成立の雌では子宮および膣に粘液の貯留による内腔拡張が認められた。これは雌動物に非特異的に観察される所見である。

11) 組織所見(Table 4, 5)

著明な体重低下とともに、腹部膨満を伴つて衰弱死あるいは切迫解剖した4例では、前胃あるいは腺胃にびらんが認められ、そのうちの2例では前胃粘膜の肥厚も観察された。さらに1例では回腸にも潰瘍が認められた。また、衰弱死あるいは衰弱による切迫解剖例では、全例に脾臓外分泌腺腺房細胞のチモーゲン顆粒の減少、肝細胞の萎縮があり、胸腺の萎縮、脾臓における髓外造血の低下、リンパ濾胞の萎縮、骨髄における造血の低下、肺のうっ血・水腫も観察された。

一方、体重減少を伴わずに急性の経過をとつて死亡した3例ではいずれも気管に著明な急性の炎症が認められ、気管の上皮は剥離して内腔には粘液および好中球を主体とした滲出液が貯留しており、気管内腔を狭窄していた。

これに伴つて全例で肺のうっ血・水腫、副腎皮質の肥大が認められた他、2例に心耳の拡張が、3例に腺胃のびらんがあり、1例では脾臓の髓外造血、骨髄の造血がむしろ増加し、これとともに脾臓のリンパ濾胞の萎縮も認められた。また、回復試験群の投与20日に死亡した300 mg/kg群の1例でも他の急死した動物と同様に肺のうっ血・水腫、気管の炎症、上皮剥離および内腔狭小化ならびに副腎皮質肥大に加え、骨髄の出血、下顎リンパ節および肝臓のうっ血ならびに肝細胞巣状壊死などが観察された。

なお、毒性試験群で肉眼的に内腔拡張の認められた小腸および大腸の粘膜に著変はなかつた。その他に偶発所見と思われる変化として、腎臓の尿細管の空胞化、腎臓および副腎の出血、膀胱炎、下垂体のラトケ囊、肝臓の小葉辺縁帯肝細胞の空胞化などが観察された。

投与期間終了時の妊娠を成立させた雄および哺育5日の雌では被験物質投与に起因した変化として、300 mg/kg群の雄2例、雌1例に腺胃のびらんが認められたほか、雄では全例の精巣でセルトリ細胞の空胞化が観察され、そのうち1例で精細管の萎縮を伴つていた。これと共に雄の全例で精巣上体管内の精子が減少しており、2例では腺管内に変性した胚上皮細胞と思われる細胞残渣の貯留が認められた。なお、これらの変化はいずれも中用量群および低用量群には観察されなかつた。

妊娠を成立させなかつた30 mg/kg群の1例に組織学的異常は観察されず、妊娠不成立の原因は不明であった。一方、300 mg/kg群の2例では、精巣にセルトリ細胞の空胞化、精巣上体における管腔内の精子減少および細胞残渣の出現が観察され、1例では局所的ではあったが精細管の萎縮も伴つていたことからこれらの変化が妊娠を成立させなかつた原因であった可能性が高い。妊娠不成立の雌では子宮の萎縮、膣の内腔拡張および炎症があり、これらの変化が不妊の原因と考えられた。

その他、雌雄ともに対照群あるいは300 mg/kg群に軽微な組織学的变化が観察されたが、いずれも当施設で観察される自然発生性変化であり、発生率にも対照群と高用量群との間に差がみられないことから、被験物質投与とは関連のない変化であると判断される。なお、雄の高用量群の1例に、心耳に限局した心筋炎と脾臓に浮腫を伴つた炎症性細胞浸潤がありこれに伴つて脾臓房細胞のチモーゲン顆粒の減少も認められたが、その毒性学的意義は明らかにすることは出来なかつた。

回復期間終了時では、被験物質投与に起因した変化として、300 mg/kg群の雄全例の精巣にセルトリ細胞の空胞化を伴つた精細管の萎縮があり、そのうち4例では間細胞(ライディッヒ細胞)の過形成も認められ、精巣の変化は投与期間終了時定期解剖例よりも増強していた。これと共に雄の全例で精巣上体腺管内の精子が減少しており、3例では腺管内に変性した胚上皮細胞と思われる細胞残渣の貯留が認められた。また、雌で肝臓の微小肉芽腫の発生が有意に減少していたが、毒性学的に意義のある変化ではなかつた。その他、雌雄ともに対照群あるいは高用量群に軽微な組織学的变化が観察されたが、いず

れも当施設で観察される自然発生性変化であり、発生率にも対照群と300 mg/kg群との間に差がみられないことから、被験物質投与とは関連のない変化であると判断される。

毒性試験群の精子形成サイクルの観察では、100 mg/kg群で対照群に比べセルトリ細胞当たりのプレレプトテン期精母細胞およびパキテン期精母細胞のそれぞれの比率が有意な低値を示した。妊娠を成立させなかつた30 mg/kg群の1例および300 mg/kg群の2例もそれぞれの細胞数は対照群と同程度であった。なお、肉眼的に両側性精巣萎縮のみられた300 mg/kg群雄の1例では、精巣の変性性・壞死性変化が強かつたことから精子形成サイクルのステージ分類が出来なかつたために評価対象から除外した。

回復期間終了時の300 mg/kg群では肉眼的に両側性の萎縮がみられ、組織学的にも精巣障害が顕著であったために肉眼的に萎縮がなかつた1例を除いて各種細胞のカウントが行えなかつた。したがって、評価できなかつた。

2. 生殖発生毒性

1) 交尾および受胎能(Table 6)

対照群を含む全ての投与群で全例が交尾した。受胎は30 mg/kg群で1例および300 mg/kg群で2例が成立せず受胎率はそれぞれ91.7および77.8 %であり、他の群ではいずれも100 %であった。

性周期観察では、異常性周期を示す動物が対照群および300 mg/kg群でそれぞれ1および2例に認められたが、300 mg/kg群の1例は偽妊娠の状態を示すものであり異常性周期発現率にも差は認められなかつた。また、平均性周期にも対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかつた。

2) 分娩および哺育(Table 7)

対照群を含むいづれの投与群でも分娩状態に異常は観察されなかつた。各群の妊娠期間、黄体数、着床痕数、出産児数および出産生児数はほぼ同様な値を示し、出産率、着床率、分娩率、出生率および性比に群間差は認められなかつた。雌新生児の4日の生存率が対照群に比べ300 mg/kg群で統計学的に有意な低値を示し、同群の雄新生児および雌雄を合わせた新生児の4日の生存率も低値傾向を示した。哺育0日に死亡児が30、100および300 mg/kg群でそれぞれ4、3および9例に観察されたが、300 mg/kg群の9例の内8例は同一腹であり、この母動物は分娩直後に死亡していた。喰殺児はいづれの群にも観察されなかつた。

3) 新生児の形態、体重および剖検所見

新生児の外表検査では、異常所見は認められなかつた。

体重変化では、300 mg/kg群で哺育4日の体重が対照群と比べ雄で有意な低値、雌で低値傾向が認められた。

哺育期間中の死亡児の剖検では、異常所見は認められ

なかつた。

哺育4日の剖検では、胃の赤色斑/区域が300 mg/kg群の雄で4例に観察され、対照群に比べ有意な発生数の増加が認められた。しかし、この所見は4例中3例が同一腹に認められたものであった。その他、肺の褐色斑/区域、腎孟拡張、尿管拡張、脳の褐色斑/区域あるいは皮膚の結節が雌雄の対照群を含む各群に単発性あるいは少数例に観察された。

考察

1. 反復投与毒性

投与期間中に雌の300 mg/kg群で6例の死亡動物および2例の切迫解剖動物が認められた。これらの動物の死亡あるいは切迫解剖に至る経過として、特に著明な一般症状の変化がなく急死する例と徐々に体重の低下と腹部膨満を伴つて全身状態が悪化する2つのタイプに分けられた。前者の経過をとつて死亡した例では、病理所見としていづれも気道(気管)に粘膜上皮細胞の剥離を伴つた著明な急性炎症があり、気道は滲出液により、著しく狭小化していた。したがつて、これらの例の主な死因は気道の急性炎症による窒息死と考えられた。一方後者の経過を辿つて死亡した例は、いづれも胃あるいは回腸にびらん・潰瘍が認められ、脾臓の外分泌腺房細胞のチモーゲン顆粒の減少と肝臓をはじめとする幾つかの器官に萎縮が認められたことから、消化管障害に伴う栄養状態の悪化が主な死因と考えられた。これらの所見から、本被験物質は、局所刺激性を有しており、そのために経口的に摂取した場合は消化管障害に、また消化管内容物の逆流などにより気道内に入った場合には気道に急性炎症を惹起し、呼吸障害に至るものと考えられた。その他、脾臓および胸腺の萎縮も伴つていたが全例ではないことから、リンパ・造血器系への直接的な影響を示すものではなく、より状態が悪い動物にみられた非特異的な変化である可能性が高い。

一般状態の変化として、雌雄の30 mg/kg以上の投与群で流涎が観察された。流涎は用量に関連して発現例数あるいは発現日数が増加していること、また、2週間投与予備試験においても100 mg/kg以上の投与群で観察されていることから被験物質投与の影響と考えられた。被験物質は強酸性物質であり、流涎はその刺激性に起因したものとも考えられた。雌雄の300 mg/kg群で認められた軟便も例数は少ないものの後述の理由から被験物質投与の影響と考えられた。30 mg/kg群で認められた軟便是雌雄いづれも1回のみの発生であり、被験物質投与との関連は明らかではなかった。

体重では、300 mg/kg群の雄では投与期間を通じて、雌では交配前投与期間に体重増加抑制が認められ、被験物質投与の影響が示唆された。

摂餌量では、雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかつた。

機能観察総合検査では、詳細な症状観察で雌雄とともに100および300 mg/kg群で一般状態と同様に流涎を示す

動物数の増加が認められた。また、雌の300 mg/kg群で投与期間中に移動量の軽度な減少を示す動物数の増加が認められ、同群の投与期間終了時および哺育4日の自発運動量が低値を示した。これら自発運動の低下は被験物質投与に起因した変化と考えられた。

臨床検査では、雄の投与期間終了時の血液学検査において300 mg/kg群でヘモグロビン量および赤血球数が低値を示し、貧血であると考えられた。この変化は2週間投与予備試験においても認められており、被験物質投与によるものと考えられた。回復期間終了時では、300 mg/kg群で白血球数、好中球数が高値を示し、炎症性の変化であると考えられた。雌の哺育5日の検査では300 mg/kg群で血小板数が低値を示し、機序は不明であるが被験物質投与の影響と考えられた。雌の回復期間終了時では、300 mg/kg群でヘモグロビン量が高値を示したが、軽度な変化であり毒性学的意義は低いと考えられた。

血液凝固能検査では、雌雄のいずれの時期にも被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかつた。

血液生化学検査において、雄の投与期間終了時および雌の哺育5日に300 mg/kg群で総蛋白が低値傾向を示し、機序は不明であったが2週間投与予備試験においてもその変化は認められており、被験物質投与の影響と考えられた。雌の哺育5日の検査において全ての投与群でコリンエステラーゼが低値を示し、被験物質投与の影響と考えられた。しかしながら、血漿コリンエステラーゼの機能は不明であるが、コリン作動性の神経伝達にはなんの関与もしていないことが知られており⁶⁾、コリン作動性効果の評価については後述する脳コリンエステラーゼ活性検査によって評価した。また、300 mg/kg群でカリウムが高値を示し、被験物質投与の影響と考えられたが機序は不明であった。雌の回復期間終了時では、300 mg/kg群でアルカリホスファターゼが高値を示したが、回復期間のみの変化であることから被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

尿検査では、雄の投与期間終了時に100および300 mg/kg群でケトン体陽性例が増加したが、軽度な変化であり被験物質投与との関連は明らかでなかった。

コリンエステラーゼ活性検査では、投与期間終了時に雄の300 mg/kg群および雌の100および300 mg/kg群で脳コリンエステラーゼ活性が低値を示し、被験物質投与の影響と考えられた。これらの変化から、脳コリンエステラーゼ活性が阻害されることにより、コリン作動性の神経伝達系への影響があると考えられた。コリンエステラーゼ活性抑制を示す有機リン剤の代表的な毒性症状として流涎および下痢が上げられることから⁷⁾、流涎や300 mg/kg群で認められた軟便は被験物質のコリンエステラーゼ活性抑制に関連した変化と考えられた。しかしながら、この変化は休薬により回復すると考えられた。

病理学検査では、毒性所見としては300 mg/kg群で精巣障害が観察されたが、投与期間終了時解剖例において、明らかな精細管萎縮あるいは胚上皮細胞障害の認められ

ない例においてもセルトリ細胞の空胞化が観察されていることから、精巣障害はセルトリ細胞障害に起因した変化であることが想定される。なお、この変化は、回復試験群においてより著明であることから、遅延性あるいは進行性病変と考えられる。精巣や精巣上体重量もこれを反映して回復期間終了時により明確な減少が認められた。また、精子形成サイクルの観察において100 mg/kg群でプレレプトテン期精母細胞およびパキテン期精母細胞のセルトリ細胞当たりの比率が低下したが、この変化も被験物質の精巣毒性を示唆するものと考えられた。なお、毒性試験群の300 mg/kg群の1例と回復試験群の300 mg/kg群の4例について精子形成サイクルのカウントができなかった。その他、雄の300 mg/kg群で肝臓、脾臓および腎臓の相対重量の高値、唾液腺の実重量の低値は体重の低値に起因する変化と考えられた。さらに回復期間終了時的心臓の相対重量の高値も体重の低値に起因する変化と考えられた。また、胸腺重量が100および300 mg/kg群で高値を示し、用量に関連した変化であることから被験物質投与の影響が示唆された。しかし、機序は不明であった。哺育5日の雌の300 mg/kg群で心臓および腎臓重量の高値も被験物質投与の影響が疑われた。

病理学検査で認められた精巣毒性および臨床検査の一部で回復性が確認できなかったが、その他の変化は回復していた。

以上のことから、O,O'-ジエチルジチオリン酸の30 mg/kg/day以上の投与により雌雄に流涎、雌に血漿コリンエステラーゼの低値が認められた。したがって、本試験条件下におけるO,O'-ジエチルジチオリン酸の反復投与による無影響量は雌雄とともに確認できず30 mg/kg/day未満と判断された。

2. 生殖発生毒性

平均性周期および交尾能に被験物質投与の影響は認められなかった。300 mg/kg群で妊娠不成立と判定された雄2例について、病理組織学検査で精巣にセルトリ細胞の空胞化、精巣上体における管腔内の精子減少および細胞残屑の出現が観察され、1例では局所的ではあったが精細管の萎縮も伴っていたことからこれらの変化が妊娠を成立させなかつた原因であると推察された。同群では前述のごとく明らかな精巣毒性が認められており、回復期間終了時の方がよりセルトリ細胞の空胞化が進んでいたことから投与期間の延長に伴い妊娠性が低下するものと考えられた。

分娩時観察では、分娩状態の異常はいずれの投与群でも認められなかつた。新生児の外表検査および哺育4日の剖検では異常は認められなかつた。300 mg/kg群で新生児の哺育4日の体重増加が抑制され、雌新生児の4日の生存率にも有意な低値が認められ、被験物質投与による新生児の発育阻害が示唆された。

その他、妊娠期間、妊娠黄体数および着床数には被験物質投与の影響は認められず、出産児数、出産死児数、性比および出産率にも影響は認められなかつた。

以上のことから、O,O'-ジエチルジチオリン酸の生殖能に及ぼす影響は100および300 mg/kg/day投与で精巣毒性が認められたことから雄の無影響量は30 mg/kg/day、雌は300 mg/kg/day投与でも影響は認められず300 mg/kg/dayと判断された。児動物の発生・発育に及ぼす影響は300 mg/kg/day投与で雌新生児の4日の生存率の有意な低値および哺育4日の体重増加抑制が認められ、無影響量は100 mg/kg/dayと判断された。

文献

- 1) 高橋道人(編)：「精巣毒性評価のための精細管アトラス」ソフトサイエンス社、東京(1994)pp.15-20.
- 2) Snedecor GW, Cochran WG: "Statistical Methods", 8th ed., Iowa State University Press, Ames(1989) pp.251-252.
- 3) Yoshida M:Exact probabilities associated with Tukey's and Dunnett's multiple comparisons procedures in imbalanced one-way ANOVA. Japanese Soc Comp Stat, 1:111-122(1988).
- 4) Steel RGD:A multiple comparison rank sum test: Treatments versus control. Biometrics, 15: 560-572(1959).
- 5) Hollander M, Wolfe DA: Nonparametric Statistical Methods, Second edition, John Wiley & Sons, New York(1999)pp.124-129.
- 6) 厚生省生活衛生局食品化学課監修：「食品中の残留農薬における毒性評価の原則」社団法人日本食品衛生協会、東京(1998)pp.65-66.
- 7) 日本トキシコロジー学会教育委員会編集：「トキシコロジー」朝倉書店、東京(2002)pp.116-117.

連絡先

試験責任者：田中亮太
試験担当者：木戸亮子、増山久美子、森山知通、常木亜沙子、牧原丈千、芝田真希、志賀敦史、宮島留美子、今井 清
（財）食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Ryota Tanaka (Study director)
Ryoko Kido, Kumiko Masuyama,
Tomonichi Moriyama,
Asako Tsuneki,
Takechi Makihara, Maki Sibata,
Atsushi Shiga, Rumiko Miyajima,
Kiyoshi Imai
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-Pyo Center)
582-2 Shioshindan Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 1 Hematological examinations of rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg ^{a)}	300 mg/kg ^{a)}
Male						
No. of animals examined						
WBC	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	10.29 ± 4.24	12.85 ± 0.62	9.87 ± 1.12	10.85 ± 2.88	10.16 ± 1.01
RBC	($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8.89 ± 0.27	8.87 ± 0.14	8.50 ± 0.20	8.47 ± 0.32*	8.58 ± 0.25
HGB	(g/dL)	15.7 ± 0.7	15.6 ± 0.6	14.9 ± 0.4	14.6 ± 0.5*	15.4 ± 0.3
HCT	(%)	44.3 ± 2.0	44.5 ± 1.7	42.0 ± 1.2	42.0 ± 0.9	43.3 ± 1.3
MCV	(μm^3)	49.8 ± 1.1	50.2 ± 1.9	49.4 ± 1.2	49.7 ± 1.3	50.5 ± 0.4
MCH	(pg)	17.6 ± 0.4	17.6 ± 0.7	17.5 ± 0.4	17.3 ± 0.8	18.0 ± 0.4
MCHC	(%)	35.3 ± 0.2	35.1 ± 0.4	35.5 ± 0.6	34.8 ± 0.8	35.6 ± 0.8
PLT	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1068 ± 110	1012 ± 60	957 ± 44	1112 ± 138	1067 ± 82
Differential leukocyte counts						
NEUT	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1.86 ± 0.54	1.55 ± 0.40	1.56 ± 0.26	2.27 ± 0.48	1.31 ± 0.54
(%)		19.0 ± 4.1	12.0 ± 2.6*	16.1 ± 4.0	21.4 ± 3.7	13.2 ± 6.0
LYMPH	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	7.87 ± 3.50	10.74 ± 0.32	7.75 ± 1.21	8.10 ± 2.46	8.52 ± 1.44
(%)		75.7 ± 3.0	83.7 ± 2.7**	78.2 ± 3.8	74.0 ± 3.9	83.5 ± 6.2
MONO	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.29 ± 0.16	0.25 ± 0.06	0.25 ± 0.04	0.24 ± 0.06	0.17 ± 0.03
(%)		2.7 ± 0.5	1.9 ± 0.5	2.6 ± 0.4	2.3 ± 0.6	1.7 ± 0.3
EOSN	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.11 ± 0.06	0.13 ± 0.05	0.16 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.02
(%)		1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.5	0.7 ± 0.2
BASO	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
(%)		0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
LUC	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.15 ± 0.08	0.16 ± 0.08	0.14 ± 0.08	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.02
(%)		1.5 ± 0.7	1.3 ± 0.6	1.4 ± 0.7	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2
Reticulocyte	(%)	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.7 ± 0.6	2.0 ± 0.4
Coagulation						
PT	(sec.)	19.3 ± 1.5	19.3 ± 0.7	20.7 ± 2.6	23.8 ± 3.9	18.8 ± 3.5
APTT	(sec.)	22.0 ± 1.8	22.9 ± 1.8	21.4 ± 2.9	22.6 ± 1.9	23.0 ± 1.8
Female						
No. of animals examined						
WBC	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	12.30 ± 2.13	11.83 ± 2.68	15.72 ± 3.80	10.58 ± 4.13	5.43 ± 1.99
RBC	($\times 10^6/\text{mm}^3$)	7.10 ± 0.48	7.12 ± 0.32	7.00 ± 0.39	6.62 ± 0.40	8.16 ± 0.44
HGB	(g/dL)	13.6 ± 0.4	13.6 ± 0.7	13.6 ± 0.6	12.9 ± 0.7	15.0 ± 0.7
HCT	(%)	39.0 ± 1.2	39.1 ± 1.1	38.1 ± 1.9	37.1 ± 1.3	41.6 ± 2.2
MCV	(μm^3)	55.0 ± 2.3	54.9 ± 1.6	54.5 ± 2.0	56.2 ± 2.4	51.0 ± 0.5
MCH	(pg)	19.2 ± 0.8	19.1 ± 0.8	19.5 ± 0.7	19.5 ± 0.6	18.4 ± 0.2
MCHC	(%)	34.9 ± 0.8	34.8 ± 1.2	35.8 ± 0.7	34.6 ± 0.8	36.1 ± 0.3
PLT	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1304 ± 60	1129 ± 109	1286 ± 256	1017 ± 89*	1061 ± 146
Differential leukocyte counts						
NEUT	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4.24 ± 1.12	4.73 ± 1.36	5.28 ± 1.70	3.01 ± 2.15	1.21 ± 0.75
(%)		34.2 ± 6.5	39.7 ± 4.7	33.9 ± 7.0	27.2 ± 11.2	21.6 ± 7.0
LYMPH	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	7.55 ± 1.33	6.59 ± 1.48	9.67 ± 2.62	7.06 ± 2.79	3.95 ± 1.38
(%)		61.6 ± 6.5	55.8 ± 4.2	61.2 ± 6.3	67.5 ± 10.5	73.5 ± 6.8
MONO	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.34 ± 0.13	0.33 ± 0.11	0.50 ± 0.08	0.27 ± 0.09	0.12 ± 0.06
(%)		2.7 ± 0.7	2.8 ± 0.9	3.3 ± 0.6	2.7 ± 0.8	2.2 ± 0.6
EOSN	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.08 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.05	0.11 ± 0.07
(%)		0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.9 ± 0.4	2.0 ± 1.0
BASO	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01
(%)		0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1
LUC	($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.17 ± 0.14	0.15 ± 0.05	0.03 ± 0.02
(%)		0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.7	1.7 ± 0.9	0.6 ± 0.2
Reticulocyte	(%)	6.0 ± 2.1	6.9 ± 1.2	7.1 ± 2.3	7.5 ± 2.8	2.0 ± 0.3
Coagulation						
PT	(sec.)	18.2 ± 0.5	17.7 ± 0.7	18.4 ± 1.0	18.5 ± 1.3	15.8 ± 1.0
APTT	(sec.)	16.7 ± 1.7	16.1 ± 2.4	17.0 ± 2.0	15.0 ± 1.3	18.6 ± 1.0

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil BASO:Basophil LUC:Large unstained cells

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *p≤0.05, **p≤0.01.

a) Recovery group

Table 2 Blood chemical examinations of rats treated orally with O,O'-diethyl dithiophosphate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg ^a	300 mg/kg ^a
Male						
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5
T.protein (g/dL)	6.28 ± 0.24	6.31 ± 0.12	6.21 ± 0.31	5.85 ± 0.33	6.08 ± 0.09 (4)	6.16 ± 0.46
Albumin (g/dL)	3.18 ± 0.16	3.21 ± 0.16	3.10 ± 0.20	3.10 ± 0.16	3.15 ± 0.11 (4)	3.13 ± 0.15
A/G	1.03 ± 0.08	1.04 ± 0.09	1.00 ± 0.11	1.13 ± 0.05	1.08 ± 0.11 (4)	1.04 ± 0.10
Glucose (mg/dL)	150 ± 4	157 ± 4	156 ± 20	140 ± 21	146 ± 5 (4)	147 ± 5
Triglyceride (mg/dL)	41.5 ± 7.4	54.1 ± 30.3	46.2 ± 36.5	64.0 ± 44.4	34.7 ± 12.5 (4)	46.6 ± 17.7
T.cholesterol (mg/dL)	70 ± 6	63 ± 15	56 ± 15	70 ± 18	64 ± 4 (4)	59 ± 9
BUN (mg/dL)	13.0 ± 1.8	12.8 ± 1.2	13.8 ± 1.7	13.7 ± 1.4	12.1 ± 1.1 (4)	12.3 ± 2.6
Creatinin (mg/dL)	0.31 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.01 (4)	0.28 ± 0.02
T.bilirubin (mg/dL)	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02 (4)	0.04 ± 0.01
AST (U/L)	78 ± 17	90 ± 18	110 ± 34	85 ± 15	86 ± 9 (4)	87 ± 9
ALT (U/L)	31 ± 7	30 ± 4	36 ± 10	37 ± 9	29 ± 2 (4)	34 ± 5
ALP (U/L)	385 ± 52	399 ± 48	476 ± 105	426 ± 79	365 ± 79 (4)	387 ± 90
Gamma-GTP (U/L)	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2 (4)	0.9 ± 0.2
ChE (U/L)	49 ± 33	48 ± 14	36 ± 9	26 ± 2	41 ± 13 (4)	43 ± 13
Calcium (mg/dL)	9.58 ± 0.17	9.64 ± 0.22	9.63 ± 0.40	9.74 ± 0.32	9.53 ± 0.11 (4)	9.53 ± 0.23
I.phosphorus (mg/dL)	6.67 ± 0.23	6.25 ± 0.24	6.07 ± 0.66	6.78 ± 0.39	6.36 ± 0.24 (4)	6.06 ± 0.29
Sodium (mmol/L)	141.9 ± 0.7	142.1 ± 0.7	141.4 ± 1.2	141.6 ± 0.6	145.3 ± 1.5 (4)	144.2 ± 1.4
Potassium (mmol/L)	4.67 ± 0.26	4.45 ± 0.36	4.65 ± 0.33	4.70 ± 0.23	4.31 ± 0.23 (4)	4.37 ± 0.32
Chloride (mmol/L)	106.9 ± 0.8	108.1 ± 0.9	108.6 ± 1.2	108.0 ± 1.7	108.4 ± 0.3 (4)	108.8 ± 1.4
Total bile acid (μmol/L)	9.9 ± 6.7	12.3 ± 6.5	16.1 ± 6.9	20.2 ± 12.2	18.5 ± 16.5 (4)	10.2 ± 3.7
Female						
No. of animals examined	5	5	5	5	5	4
T.protein (g/dL)	6.43 ± 0.35	6.18 ± 0.33	6.30 ± 0.31	5.95 ± 0.35	7.15 ± 0.48	6.50 ± 0.46
Albumin (g/dL)	3.37 ± 0.16	3.30 ± 0.12	3.35 ± 0.20	3.14 ± 0.26	3.91 ± 0.30	3.68 ± 0.15
A/G	1.11 ± 0.10	1.16 ± 0.13	1.13 ± 0.07	1.13 ± 0.14	1.21 ± 0.06	1.31 ± 0.09
Glucose (mg/dL)	150 ± 12	138 ± 16	146 ± 7	143 ± 18	133 ± 9	129 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	71.5 ± 25.5	44.6 ± 19.0	53.6 ± 25.0	58.9 ± 31.1	39.3 ± 20.1	23.1 ± 15.9
T.cholesterol (mg/dL)	68 ± 19	76 ± 11	72 ± 19	81 ± 16	87 ± 23	74 ± 10
BUN (mg/dL)	15.4 ± 1.5	15.0 ± 1.7	15.2 ± 2.5	15.4 ± 2.3	15.7 ± 1.8	14.0 ± 2.2
Creatinin (mg/dL)	0.37 ± 0.01	0.32 ± 0.03*	0.35 ± 0.06	0.30 ± 0.04*	0.35 ± 0.04	0.34 ± 0.04
T.bilirubin (mg/dL)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01
AST (U/L)	131 ± 56	105 ± 12	97 ± 5	103 ± 12	133 ± 122	74 ± 7
ALT (U/L)	64 ± 29	46 ± 9	52 ± 4	46 ± 8	61 ± 64	24 ± 3
ALP (U/L)	276 ± 51	278 ± 81	298 ± 94	282 ± 77	147 ± 22	237 ± 31**
Gamma-GTP (U/L)	1.1 ± 0.8	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.1
ChE (U/L)	375 ± 46	210 ± 75*	135 ± 63*	80 ± 7*	557 ± 152	514 ± 207
Calcium (mg/dL)	9.92 ± 0.12	10.07 ± 0.23	10.18 ± 0.28	10.19 ± 0.43	10.21 ± 0.33	9.75 ± 0.29
I.phosphorus (mg/dL)	8.62 ± 1.09	8.29 ± 1.17	7.53 ± 0.86	7.22 ± 0.47	4.59 ± 0.73	4.62 ± 0.92
Sodium (mmol/L)	141.7 ± 0.9	141.1 ± 0.7	141.6 ± 0.8	141.1 ± 0.7	142.7 ± 1.3	144.1 ± 0.4
Potassium (mmol/L)	4.02 ± 0.46	4.43 ± 0.30	4.12 ± 0.25	4.65 ± 0.43*	4.13 ± 0.09	4.15 ± 0.34
Chlorid (mmol/L)	105.8 ± 1.5	106.4 ± 1.6	106.6 ± 1.0	106.5 ± 3.0	109.0 ± 1.3	110.2 ± 0.6
Total bile acid (μmol/L)	14.4 ± 10.0	15.8 ± 7.2	28.6 ± 26.2	24.1 ± 15.6	19.2 ± 7.1	14.9 ± 5.4

Values are expressed as Mean ± S.D.

Values in parentheses are expressed no. of animals examined

Significant difference from control group; *p≤0.05. **p≤0.01.

a) Recovery group

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 3 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg ^a	300 mg/kg ^a
Male						
No. of animals examined	7	12	11	7	5	5
Body weight (g)	431 ± 34	424 ± 36	428 ± 42	410 ± 23	427 ± 37	415 ± 22
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.10 ± 0.07	2.17 ± 0.08	2.26 ± 0.09**	2.20 ± 0.11	2.14 ± 0.09	2.13 ± 0.08
Salivary gland (mg)	717 ± 57	681 ± 43	700 ± 84	618 ± 79*	700 ± 79	637 ± 52
Thyroid gland (mg)	23 ± 7	23 ± 6	26 ± 8	26 ± 7	23 ± 6	24 ± 3
Thymus (mg)	262 ± 48	312 ± 57	340 ± 84*	355 ± 35*	292 ± 129	306 ± 94
Heart (g)	1.34 ± 0.12	1.36 ± 0.10	1.35 ± 0.12	1.28 ± 0.06	1.27 ± 0.05	1.47 ± 0.21
Liver (g)	11.05 ± 1.47	10.76 ± 1.25	11.46 ± 1.74	11.63 ± 1.08	10.75 ± 1.77	10.95 ± 1.11
Spleen (g)	0.64 ± 0.10	0.67 ± 0.10	0.70 ± 0.06	0.71 ± 0.11	0.62 ± 0.08	0.75 ± 0.15
Kidneys (g)	2.91 ± 0.34	2.90 ± 0.26	3.12 ± 0.42	3.06 ± 0.21	2.90 ± 0.38	3.00 ± 0.24
Adrenals (mg)	59 ± 13	55 ± 11	54 ± 7	53 ± 11	54 ± 9	51 ± 2
Testes (g)	3.10 ± 0.18	3.29 ± 0.23	3.19 ± 0.22	2.61 ± 0.60	3.23 ± 0.34	1.55 ± 0.32**
Epididymides (mg)	1172 ± 93	1248 ± 76	1217 ± 85	944 ± 108**	1321 ± 91	854 ± 71**
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.489 ± 0.037	0.516 ± 0.057	0.533 ± 0.050	0.536 ± 0.017	0.503 ± 0.048	0.514 ± 0.040
Salivary gland (mg%)	166.641 ± 6.976	161.508 ± 16.691	164.012 ± 18.054	150.646 ± 17.835	164.442 ± 19.646	154.034 ± 17.206
Thyroid gland (mg%)	5.281 ± 1.389	5.465 ± 1.582	6.041 ± 1.647	6.211 ± 1.671	5.379 ± 1.444	5.717 ± 0.974
Thymus (mg%)	60.551 ± 8.153	73.525 ± 12.011	80.526 ± 23.539	86.719 ± 9.318**	69.166 ± 30.351	74.137 ± 23.972
Heart (g%)	0.312 ± 0.019	0.322 ± 0.025	0.315 ± 0.021	0.314 ± 0.023	0.299 ± 0.019	0.355 ± 0.051*
Liver (g%)	2.558 ± 0.169	2.535 ± 0.139	2.666 ± 0.157	2.834 ± 0.187**	2.508 ± 0.254	2.635 ± 0.190
Spleen (g%)	0.148 ± 0.019	0.159 ± 0.018	0.165 ± 0.013	0.174 ± 0.026*	0.145 ± 0.010	0.183 ± 0.040
Kidneys (g%)	0.675 ± 0.047	0.684 ± 0.042	0.729 ± 0.061	0.748 ± 0.058*	0.678 ± 0.055	0.723 ± 0.064
Adrenals (mg%)	13.762 ± 2.552	13.071 ± 2.357	12.708 ± 2.022	13.082 ± 3.197	12.646 ± 1.740	12.276 ± 1.085
Testes (g%)	0.725 ± 0.094	0.779 ± 0.075	0.749 ± 0.074	0.642 ± 0.167	0.758 ± 0.050	0.374 ± 0.073**
Epididymides (mg%)	274.114 ± 37.841	296.404 ± 31.391	286.335 ± 30.898	231.012 ± 34.904	310.335 ± 21.985	205.984 ± 16.992**
Female						
No. of animals examined	12	11	12	5	5	4
Body weight (g)	290 ± 18	292 ± 24	281 ± 16	286 ± 12	270 ± 15	262 ± 28
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.05 ± 0.12 (11)	1.99 ± 0.04	2.07 ± 0.07	2.09 ± 0.12	1.97 ± 0.12	1.98 ± 0.03
Salivary gland (mg)	534 ± 30	501 ± 58	518 ± 38	506 ± 37	429 ± 20	403 ± 34
Thyroid gland (mg)	20 ± 4	18 ± 4	18 ± 4	18 ± 3	15 ± 4	19 ± 7
Thymus (mg)	253 ± 65	226 ± 29	202 ± 82	224 ± 42	263 ± 38	266 ± 59
Heart (g)	0.97 ± 0.07	0.96 ± 0.06	0.98 ± 0.09	1.05 ± 0.11	0.92 ± 0.12	0.88 ± 0.02
Liver (g)	9.52 ± 0.84	9.69 ± 0.87	9.73 ± 0.59	10.44 ± 1.37	6.93 ± 0.59	6.46 ± 0.44
Spleen (g)	0.57 ± 0.08	0.61 ± 0.08	0.59 ± 0.06	0.58 ± 0.10	0.46 ± 0.04	0.44 ± 0.01
Kidneys (g)	2.01 ± 0.25	1.99 ± 0.21	2.02 ± 0.19	2.39 ± 0.39*	1.83 ± 0.14	1.84 ± 0.17
Adrenals (mg)	72 ± 9	67 ± 10	68 ± 8	72 ± 7	70 ± 6	66 ± 5
Ovaries (mg)	93 ± 11	91 ± 17	91 ± 20	92 ± 7	76 ± 10	84 ± 8
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.709 ± 0.045(11)	0.684 ± 0.052	0.740 ± 0.053	0.732 ± 0.037	0.731 ± 0.028	0.761 ± 0.083
Salivary gland (mg%)	184.646 ± 14.805	171.664 ± 17.397	184.596 ± 10.829	177.202 ± 13.015	159.329 ± 10.415	154.524 ± 12.990
Thyroid gland (mg%)	6.780 ± 1.371	6.256 ± 1.229	6.230 ± 1.298	6.287 ± 1.003	5.724 ± 1.455	7.432 ± 2.969
Thymus (mg%)	87.074 ± 20.569	77.436 ± 8.683	71.426 ± 27.988	78.682 ± 16.277	97.765 ± 15.371	101.983 ± 23.926
Heart (g%)	0.334 ± 0.026	0.329 ± 0.019	0.347 ± 0.022	0.369 ± 0.042*	0.340 ± 0.032	0.336 ± 0.033
Liver (g%)	3.282 ± 0.266	3.317 ± 0.167	3.468 ± 0.118	3.648 ± 0.313	2.571 ± 0.174	2.476 ± 0.163
Spleen (g%)	0.196 ± 0.022	0.208 ± 0.021	0.212 ± 0.021	0.205 ± 0.038	0.172 ± 0.012	0.168 ± 0.017
Kidneys (g%)	0.690 ± 0.065	0.682 ± 0.063	0.722 ± 0.066	0.838 ± 0.142**	0.679 ± 0.045	0.708 ± 0.103
Adrenals (mg%)	25.039 ± 3.605	23.007 ± 4.351	24.427 ± 3.143	25.158 ± 2.476	26.207 ± 3.223	25.466 ± 2.909
Ovaries (mg%)	32.176 ± 3.894	31.426 ± 6.199	32.486 ± 7.512	32.457 ± 3.435	28.307 ± 3.860	32.238 ± 2.329

Values are expressed as Mean ± S.D.

(%) (Organ weight / body weight) × 100

Values in parentheses are expressed no. of animals examined

Significant difference from control group; *p≤0.05, **p≤0.01.

a) Recovery group

Table 4 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with O,O'-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Reprotox study)

Dose level (mg/kg)	Sacrificed												Non-pregnancy							
	0			30			100			300			30			300				
Organ Findings	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T
Male																				
No. of animal's necropsied	7				11				11				5				1			2
CARDIOVASCULAR SYSTEM																				
heart	(5)				(0)				(1)				(3)				(0)			(0)
cardiomyopathy	1	0	0	1	-	-	-	1	0	0	1	1	0	0	1	-	-	-	-	
myocarditis	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-	
DIGESTIVE SYSTEM																				
glandular stomach	(5)				(5)				(5)				(3)				(0)			(0)
erosion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	-	-	-	
exocrine pancreas	(5)				(0)				(0)				(3)				(0)			(0)
edema	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-	
atrophy, acinus	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-	
decrease, zymogen granules, acinar cell	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-	
cellular infiltration, mixed cell	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-	
ileum	(5)				(0)				(1)				(3)				(0)			(0)
diverticula	0	0	0	0	-	-	-	1	0	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-	
liver	(5)				(1)				(0)				(3)				(0)			(0)
atrophy, hepatocyte	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	
vacuolation, hepatocyte	5	0	0	5	0	0	0	0	-	-	-	3	0	0	3	-	-	-	-	
microgranuloma	5	0	0	5	0	0	0	0	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-	
URINARY SYSTEM																				
kidney	(5)				(1)				(0)				(3)				(0)			(0)
basophilic tubules	2	0	0	2	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	
dilatation	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	
hyaline droplet	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	2	0	0	2	-	-	-	-	
REPRODUCTIVE SYSTEM																				
testis	(5)				(5)				(5)				(3)				(1)			(2)
Sertoli only syndrome	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	
atrophy, seminiferous tubule	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	
vacuolation, Sertoli cell	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3*	#	0	0	
epididymis	(5)				(5)				(5)				(3)				(1)			(2)
cell debris, lumen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	
decrease, sperm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	3*	#	0	0	
prostate	(5)				(0)				(0)				(3)				(0)			(0)
cellular infiltration, lymphocyte	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0	3	-	-	-	-	
ENDOCRINE SYSTEM																				
thyroid gland	(5)				(0)				(0)				(3)				(0)			(0)
ultimobranchial remnant	3	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	
SPECIAL SENSE SYSTEM																				
Harderian gland	(5)				(0)				(0)				(3)				(0)			(0)
cellular infiltration, lymphocyte	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	

Grade of histopathological finding; 1:slight, 2:moderate, 3:marked T:Total -:Not examined

Numbers in parentheses indicate no. of animals examined microscopically at this site

Significant difference from control group; Fisher: $*p \leq 0.05$, Mann-Whitney: $\#p \leq 0.05$.

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 4 (Continued)

Dose level (mg/kg)	Dead or Moribund								Sacrificed								Non-pregnancy							
	300				0				30				100				300				30			
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T
Organ Findings																								
Female																								
No. of animals necropsied	7				12				11				12				5				1			
CARDIOVASCULAR SYSTEM					(7)				(5)				(0)				(5)				(0)			
heart	(3)	0	0	3	-	-	-	-	(5)	-	-	-	(0)	-	-	-	(5)	-	-	-	(0)	-	-	-
dilatation, auricle	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-
myocarditis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HEMATOPOIETIC SYSTEM					(7)				(5)				(0)				(5)				(0)			
bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-	(5)	-	-	-	(0)	-	-	-	(5)	-	-	-	-	-	-	-
hemorrhage	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hematopoiesis, decreased	0	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hematopoiesis, increased	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
erythropoiesis, increased	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-
spleen	(6)				(5)				(0)				(0)				(5)				(0)			
atrophy	4	0	0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dec., extramedull. hematopoiesis	3	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inc., extramedull. hematopoiesis	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
erythropoiesis, increased	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-
thymus	(7)				(5)				(0)				(3)				(5)				(0)			
hemorrhage	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
atrophy	0	1	3	4	0	0	0	0	-	-	-	-	3	0	0	3	0	0	0	0	-	-	-	-
RESPIRATORY SYSTEM					(7)				(7)				(0)				(1)				(5)			
lung	-	-	-	-	4	0	0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
congestion	4	0	0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
edema	4	0	0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hemorrhage	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	1	0	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-
accumulation of foamy cells	-	-	-	-	2	0	0	2	-	-	-	-	0	0	0	0	2	0	0	2	-	-	-	-
dilatation, alveolus	-	-	-	-	2	0	0	2	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
trachea	(7)				(0)				(0)				(0)				(0)				(0)			
desquamation epithelium	3	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
narrowing, lumen	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
suppurative inflammation	2	0	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DIGESTIVE SYSTEM					(0)				(5)				(1)				(0)				(5)			
tongue	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-
erosion	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-
hyperplasia, mucosa	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-
forestomach	(7)				(0)				(0)				(0)				(0)				(0)			
erosion	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
squamous hyperplasia	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glandular stomach	(7)				(6)				(5)				(5)				(5)				(0)			
hemorrhage	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
erosion	6	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-
exocrine pancreas	(7)				(5)				(0)				(0)				(5)				(0)			
decrease, zymogen granules, acinar cell	1	2	1	4	0	2	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-
duodenum	(4)				(0)				(0)				(0)				(0)				(0)			
dilatation, lumen	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ileum	(5)				(0)				(0)				(0)				(0)				(0)			
ulcer	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
liver	(7)				(6)				(1)				(0)				(5)				(0)			
congestion	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
atrophy, hepatocyte	4	0	0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vacuolation, hepatocyte	3	0	0	3	5	0	0	5	0	0	0	0	-	-	-	-	5	0	0	5	-	-	-	-
necrosis, hepatocyte, focal	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-
microgranuloma	-	-	-	-	1	0	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-
extramedullary hematopoiesis	-	-	-	-	2	0	0	2	0	0	0	0	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-
hepatodiaphragmatic nodule	-	-	-	-	1	0	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-
focus of cellular alteration	-	-	-	-	1	0	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-
salivary gland	(7)				(0)				(0)				(0)				(0)				(0)			
atrophy, acinus	0	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URINARY SYSTEM					(7)				(5)				(0)				(1)				(5)			
kidney	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hemorrhage	2	0	0	2	3	0	0	3	-	-	-	-	0	0	0	0	2	0	0	2	-	-	-	-
vacuolation, tubular epithelium	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-
dilatation, tubules	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-
dilatation, renal pelvis	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	1	0	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-
REPRODUCTIVE SYSTEM					(0)				(0)				(0)				(0)				(0)			
uterus	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
atrophy	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vagina	(7)				(0)				(0)				(0)				(0)				(0)			
suppurative inflammation	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dilatation, lumen	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inflammation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENDOCRINE SYSTEM					(6)				(0)				(0)				(0)				(0)			
pituitary gland	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rathke's pouch	-	-																						

Table 5 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Recovery study)

Dose level (mg/kg)	Sacrificed							
	0				300			
Organ Findings	1	2	3	T	1	2	3	T
Male								
No. of animals necropsied					5			5
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
heart	(5)				(5)			
cardiomyopathy	2	0	0	2	2	0	0	2
RESPIRATORY SYSTEM								
lung	(5)				(5)			
hemorrhage	0	0	0	0	1	0	0	1
accumulation of foamy cells	1	0	0	1	1	0	0	1
hypertrophy, alveolar cell	0	0	0	0	1	0	0	1
osseous metaplasia	1	0	0	1	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM								
exocrine pancreas	(5)				(5)			
decrease, zymogen granules, acinar cell	0	0	0	0	0	1	0	1
colon	(5)				(5)			
hemorrhage	1	0	0	1	0	0	0	0
liver	(5)				(5)			
fatty change, hepatocyte	0	0	0	0	2	0	0	2
vacuolation, hepatocyte	5	0	0	5	5	0	0	5
microgranuloma	3	0	0	3	3	0	0	3
URINARY SYSTEM								
kidney	(5)				(5)			
basophilic tubules	3	0	0	3	3	0	0	3
hyaline droplet	3	0	0	3	2	0	0	2
REPRODUCTIVE SYSTEM								
testis	(5)				(5)			
atrophy, seminiferous tubule	0	0	0	0	1	1	3	5**##
decrease, germ cell	0	0	0	0	1	2	2	5**##
vacuolation, Sertoli cell	0	0	0	0	1	1	3	5**##
interstitial cell hyperplasia	0	0	0	0	3	1	0	4*#
epididymis	(5)				(5)			
cell debris, lumen	0	0	0	0	2	1	0	3
decrease, sperm	0	0	0	0	0	0	5	5**##
prostate	(5)				(5)			
cellular infiltration, lymphocyte	3	0	0	3	4	0	0	4
SPECIAL SENSE SYSTEM								
Harderian gland	(5)				(5)			
cellular infiltration, lymphocyte	1	0	0	1	0	0	0	0

Grade of histopathological finding; 1:slight, 2:moderate, 3:marked T:Total

Numbers in parentheses indicate no. of animals examined microscopically at this site

Significant difference from control group; Fisher: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Mann-Whitney: # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$.

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 5 (Continued)

Dose level (mg/kg)	Dead				Sacrificed			
	300				0			
	1	2	3	T	1	2	3	T
Female								
No. of animals necropsied	1				5			4
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
heart	(0)				(5)			(4)
cardiomyopathy	-	-	-	-	0	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
bone marrow	(1)				(0)			(0)
hemorrhage	1	0	0	1	-	-	-	-
lymph node	(1)				(0)			(0)
congestion	1	0	0	1	-	-	-	-
thymus	(0)				(5)			(4)
Kuersteiner's duct/cyst	-	-	-	-	1	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM								
lung	(1)				(5)			(4)
congestion	1	0	0	1	-	-	-	-
edema	1	0	0	1	-	-	-	-
thickening, alveolar wall	-	-	-	-	1	0	0	1
cellular infiltration, lymphocyte	-	-	-	-	1	0	0	0
trachea	(1)				(0)			(0)
desquamation epithelium	1	0	0	1	-	-	-	-
narrowing, lumen	1	0	0	1	-	-	-	-
suppurative inflammation	1	0	0	1	-	-	-	-
DIGESTIVE SYSTEM								
glandular stomach	(0)				(5)			(4)
erosion	-	-	-	-	1	0	0	1
exocrine pancreas	(0)				(5)			(4)
decrease, zymogen granules, acinar cell	-	-	-	-	0	0	0	0
liver	(1)				(5)			(4)
congestion	1	0	0	1	-	-	-	-
necrosis, hepatocyte, focal	1	0	0	1	0	0	0	1
vacuolation, hepatocyte	1	0	0	1	3	0	0	4
hemorrhage	-	-	-	-	1	0	0	1
microgranuloma	-	-	-	-	5	0	0	1
URINARY SYSTEM								
kidney	(0)				(5)			(4)
vacuolation, tubular epithelium	-	-	-	-	3	0	0	1
cellular infiltration, lymphocyte	-	-	-	-	0	0	0	2
REPRODUCTIVE SYSTEM								
uterus	(0)				(5)			(4)
dilatation, lumen	-	-	-	-	0	0	0	1
vagina	(0)				(5)			(4)
dermoid cyst	-	-	-	-	-	1\$	-	0
ENDOCRINE SYSTEM								
adrenal gland	(1)				(0)			(0)
hypertrophy, cortex	0	0	1	1	-	-	-	-
pituitary gland	(0)				(5)			(4)
Rathke's pouch	-	-	-	-	1	0	0	0
thyroid gland	(0)				(5)			(4)
ultimobranchial remnant	-	-	-	-	1	0	0	2
NERVOUS SYSTEM								
sciatic nerve	(0)				(5)			(4)
cellular infiltration, lymphocyte	-	-	-	-	1	0	0	0
INTEGUMENTARY SYSTEM								
subcutaneous tissue	(1)				(0)			(0)
congestion	1	0	0	1	-	-	-	-

Grade of histopathological finding; 1:slight, 2:moderate, 3:marked T:Total -:Not examined \$:benign

Numbers in parentheses indicate no. of animals examined microscopically at this site

Significant difference from control group; Fisher:\$p≤0.05.

Table 6 Summary of reproductive performance and estrous cycle in rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	10
No. of pairs copulated	12	12	12	10
No. of pregnant females	12	11	12	7
Copulation index(%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Fertility index(%) ^{b)}	100.0	91.7	100.0	77.8 (9)
Estrous cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Mean estrous cycle(Days, Mean ± S.D.)	4.2±0.3 (12)	4.1±0.2 (12)	4.1±0.2 (12)	4.7±1.4 (10)
Irregular estrous cycle ^{c)} (%) ^{d)}	1(8.3)	0(0.0)	0(0.0)	2(20.0)

a) (No. of animals with successful copulation/no. of animals mated)×100

b) (No. of pregnant animals/no. of animals with successful copulation)×100

c) No. of animals having irregular estrous cycle

d) (No. of animals having irregular estrous cycle/no. of animals examined)×100

Values in parentheses are expressed no. of animals observed

Table 7 Findings of delivery in dams treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate and observations on their pups in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
No. of pregnant females	12	11	12	6
No. of dams delivered live pups	12	11	12	6
Duration of gestation (Day, Mean ± S.D.)	22.3±0.5	22.3±0.5	22.4±0.5	22.7±0.5
No. of corpora lutea (Mean ± S.D.)	187(15.6±1.4)	195(17.7±2.5)	193(16.1±2.1)	103(17.2±2.9)
No. of implantation sites (Mean ± S.D.)	170(14.2±1.9)	166(15.1±1.3)	173(14.4±1.2)	85(14.2±3.3)
No. of pups born (Mean ± S.D.)	157(13.1±2.4)	153(13.9±1.5)	161(13.4±1.9)	79(13.2±3.2)
No. of live pups born (Mean ± S.D.)				
Total	157(13.1±2.4)	149(13.5±1.5)	158(13.2±1.7)	70(11.7±3.7)
Male	75(6.3±1.9)	77(7.0±2.2)	82(6.8±2.9)	34(5.7±2.3)
Female	82(6.8±1.8)	72(6.5±2.5)	76(6.3±2.9)	36(6.0±1.8)
Sex ratio (Male/female, Mean ± S.D.)	0.99±0.41	1.46±1.41	1.51±1.09	0.95±0.34
No. of live pups on day 4 (Mean ± S.D.)				
Total	156(13.0±2.4)	146(13.3±1.4)	157(13.1±1.6)	55(11.0±2.2)
Male	74(6.2±1.9)	75(6.8±2.3)	82(6.8±2.9)	28(5.6±2.1)
Female	82(6.8±1.8)	71(6.5±2.5)	75(6.3±3.0)	27(5.4±0.5)
No. of dead pups (Mean ± S.D.)	0(0.0±0.0)	4(0.4±0.7)	3(0.3±0.6)	9(1.5±3.2)
No. of cannibalism (Mean ± S.D.)	0(0.0±0.0)	0(0.0±0.0)	0(0.0±0.0)	0(0.0±0.0)
Gestation index ^{a)} (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index ^{b)} (% , Mean ± S.D.)	91.1±10.6	86.4±11.8	90.5±9.6	83.0±17.1
Delivery index ^{c)} (% , Mean ± S.D.)	91.9±6.9	92.3±7.9	92.9±8.4	92.8±4.9
Live birth index ^{d)} (% , Mean ± S.D.)	100.0±0.0	97.5±4.7	98.4±4.1	90.0±21.4
Viability index on day 4 ^{e)} (% , Mean ± S.D.)				
Total	99.4±2.2	98.1±3.3	99.5±1.8	89.6±15.7
Male	98.6±4.8	97.2±6.3	100.0±0.0	91.0±12.4
Female	100.0±0.0	98.7±4.3	98.6±4.8	88.3±19.3*

a) (No. of females with live pups/no. of pregnant females)×100

b) (No. of implantations/no. of corpora lutea)×100

c) (No. of pups born/no. of implantation sites)×100

d) (No. of live pups born/no. of pups born)×100

e) (No. of live pups on day 4 after birth/no. of live pups born)×100

Significant difference from control group; *p≤0.05.

*O,O'-ジエチルジチオリン酸*の細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of *O,O'-Diethyl dithiophosphate* in Bacteria

要約

*O,O'-ジエチルジチオリン酸*について、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

試験菌株として、*Salmonella typhimurium*(TA100, TA98, TA1535, TA1537)および*Escherichia coli*(WP2 *uvrA*)の5菌株を用いた。用量設定試験においてはS9 mix無添加群および添加群の各試験菌株において2.29～5000 µg/plateの8用量、本試験ではS9 mix無添加群のTA100で39.1～2500 µg/plateの7用量、TA1535で9.77～625 µg/plateの7用量、WP2 *uvrA*, TA98およびTA1537で156～5000 µg/plateの6用量、S9 mix添加群のTA100およびTA1535で78.1～5000 µg/plateの7用量、WP2 *uvrA*, TA98およびTA1537で156～5000 µg/plateの6用量で試験を実施した。本試験においてS9 mix無添加群、TA1535の溶媒対照値の平均値が背景データの範囲から逸脱し、一部の試験において用量の設定が適切でなかったため、S9 mix無添加群のTA100およびTA1537で19.5～1250 µg/plateの7用量、TA1535で9.77～625 µg/plateの7用量、S9 mix無添加群および添加群のWP2 *uvrA*ならびにS9 mix添加群のTA98で156～5000 µg/plateの6用量、S9 mix無添加群のTA98およびS9 mix添加群のTA100で39.1～5000 µg/plateの8用量、S9 mix添加群のTA1535で78.1～5000 µg/plateの7用量、TA1537で78.1～2500 µg/plateの6用量で再試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群のTA100, TA1535, WP2 *uvrA*ならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535において用量に依存した復帰変異コロニー数の増加が認められた。用量設定試験、本試験ならびに再試験により試験結果の再現性が確認されたことから陽性反応と判断した。

以上の結果より、本試験条件下では*O,O'-ジエチルジチオリン酸*は、変異原性を有する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537¹⁾ならびにトリプトファン要求性の*Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア

大学のAmes BN教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成14年9月30日～10月3日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK KGaA)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80°Cで保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業製のテスマディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02 %硫酸マグネシウム・7水塩、0.2 %クエン酸・1水塩、1 %リン酸二カリウム・無水塩、0.192 %リン酸一アンモニウム、0.066 %水酸化ナトリウム[いずれも最終濃度])に2 %のグルコース(和光純薬工業)と1.15 %の寒天(伊那寒天BA-30 A)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5 w/v%を含む0.6 w/v% Bacto-agar(Difco)水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学)-0.5 mmol/L D-ビオチン(関東化学)水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン(関東化学)水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mLのバッフル付三角フラスコに2.5 w/v%ニュートリエントプロス(Oxoid Nutrient Broth No.2:OXOID)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50 µL接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック)を用い、37°Cで8時間振盪(往復振盪:100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-

Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Na- リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol
蒸留水	残量

5. 被験物質

被験物質のO,O'-ジエチルジチオリン酸(ロット番号: TCQ2466)は純度95.1%の暗灰褐色透明の液体である。本剤はDMSOに易溶である。和光純薬工業(静岡)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷蔵で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSOを用いて溶解し、調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。

7. 試験用量の設定

2.29～5000 μg/plateの8用量(公比3)を用いて用量設定試験を実施した。S9 mix無添加群のTA100, TA1535ならびにS9 mix添加群のTA1535で用量に依存した復帰変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照値の2倍を超えていた。試験菌株に対する生育阻害作用はS9 mix無添加群の場合、TA100の556 μg/plate以上、TA1537の1667 μg/plate以上、他の3菌株の5000 μg/plateで観察された。また、S9 mix添加群の場合はTA100の1667 μg/plate以上、TA1537の5000 μg/plateで観察された。被験物質処理時、S9 mix無添加群および添加群とも556 μg/plate以上の用量で反応液が白濁し、さらに1667 μg/plate以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。コロニー計数時、両群の5000 μg/plateで白色粉末状の析出物が観察された。

従って、本試験においてTA100およびTA1535では、正確な用量反応曲線が得られる用量、すなわち、S9 mix無添加群のTA100において2500 μg/plate、TA1535において625 μg/plateを、S9 mix添加群のTA1535において5000 μg/plateを最高用量とし、それぞれ7用量(公比2)を設定した。他の菌株については、生育阻害作用が認められると考えられる用量あるいは5000 μg/plateを最高用量とし、S9 mix添加群のTA100では7用量(公比2)、S9 mix無添加群および添加群のWP2 uvrA, TA98およびTA1537ではそれぞれ6用量(公比2)を設定した。

また、本試験のTA1535(S9 mix無添加群)において、溶媒対照値の平均値が背景データの範囲から逸脱していること、一部の試験において用量の設定が適切でなかつたことから再試験を実施し、S9 mix無添加群のTA100およびTA1537において1250 μg/plateを、TA1535において625 μg/plateを最高用量とし、それぞれ7用量(公比2)、S9 mix添加群のTA1537において2500 μg/plateを最高用量とし6用量(公比2)、他の菌株においては5000 μg/plateを最高用量とし、S9 mix無添加群および添加群のWP2 uvrAならびにS9 mix添加群のTA98ではそれぞれ6用量(公比2)、S9 mix無添加群のTA98およびS9 mix添加群のTA100ではそれぞれ8用量(公比2)、S9 mix添加群のTA1535では7用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した調製済み陽性対照物質溶液(オリエンタル酵母工業)を使用した。

- 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(AF-2)
- アジ化ナトリウム(NaN₃)
- 9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA)
- 2-アミノアントラセン(2-AA)

9. 試験方法

Amesらの原法¹⁾の改良法であるプレインキュベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μL、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μL、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500 μL添加し、さらに試験菌液100 μLを加え、37°Cで20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、あらかじめ45°Cに保温したトップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。37°Cの条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡(×60)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス)を用いた。なお、本試験におけるS9 mix無添加群、TA100およびTA1535の2500 μg/plate以上、WP2 uvrAおよびTA98ならびにS9 mix添加群、TA1537の5000 μg/plateさらに再試験におけるS9 mix無添加群、TA98の5000 μg/plateでは析出物の影響によりコロニーアナライザーの使用が不適切と判断し、目視でコロニーを計数した。また、本試験のS9 mix無添加群、TA1537の5000 μg/plateでは背景菌が目視できるほどのコロニーを形成していたことから目視でコロニーを計数した。各濃度につき3枚のプレートを使用した。

10. 結果の解析

復帰変異コロニー数が溶媒対照の2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認めら

れた場合に、陽性と判定した。なお、陽性と判定した菌株については、変異原性の強さの相対的比較値である比変異活性(比活性)を、当該濃度における誘発平均コロニー数(当該濃度での平均コロニー数-溶媒対照での平均コロニー数)を当該濃度値(mg)で除すことにより算出した。コロニー数の平均値は四捨五入する以前の値を用いた。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

用量設定試験の結果をTable 1~2に、本試験の結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群のTA100, TA1535ならびにS9 mix添加群のTA1535でO,O'-ジエチルジチオリン酸処理による用量に依存した復帰変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照値の2倍を超えていた。試験菌株に対する生育阻害作用はS9 mix無添加群の場合、TA100, TA1537の313 µg/plate以上、TA98の1250 µg/plate以上、WP2 uvrAの5000 µg/plateで観察された。またS9 mix添加群の場合はTA100の625 µg/plate以上、TA1537の2500 µg/plate以上の用量で観察された。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。なお、被験物質処理時、S9 mix無添加群の313 µg/plate以上およびS9 mix添加群の156 µg/plate以上の用量で反応液が白濁し、S9 mix無添加群の2500 µg/plate以上ならびにS9 mix添加群の625 µg/plate以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。コロニー計数時、S9 mix無添加群の2500 µg/plate以上、S9 mix添加群の1250 µg/plate以上の用量で白色粉末状の析出物が観察された。また、S9 mix無添加群のTA1535において、溶媒対照値の平均値が背景データの範囲から逸脱し、一部の試験において用量の設定が適切でなかったため、再試験を実施し、結果をTable 5~6に示した。S9 mix無添加群のTA100, TA1535、WP2 uvrAならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535でO,O'-ジエチルジチオリン酸処理による用量に依存した復帰変異コロニー数の増加が認められ、溶媒対照値の2倍を超えていた。試験菌株に対する生育阻害作用はS9 mix無添加群の場合、TA100, TA1537の313 µg/plate以上、TA98の2500 µg/plate以上、WP2 uvrAの5000 µg/plateで観察された。また、S9 mix添加群の場合はTA100の1250 µg/plate以上、TA1537の2500 µg/plateで観察された。変異原性の強さに関する相対的比較値である比活性の最高値は1691(S9 mix無添加群、TA1535, 625 µg/plate)と算出された。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株に対し、溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。なお、被験物質処理時、S9 mix無添加群の156 µg/plate以上およびS9 mix添加群の313 µg/plate以上の用量で反応液が白濁し、S9 mix無添加群の2500 µg/plate以上ならびにS9 mix添加群の1250 µg/plate以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた。コロニー計数時、S9 mix無添加群の2500 µg/plate以上、S9 mix添加群の1250 µg/plate以上

の用量で白色粉末状の析出物が観察された。

以上の試験結果から、本試験条件下において、O,O'-ジエチルジチオリン酸の微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陽性と判定した。

なお、本被験物質(O,O'-ジエチルジチオリン酸)について遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった。類縁体であるO,O-diethyl S-[2-(ethylthio)ethyl] esterについてCHL細胞を用いたin vitro小核ならびにマウスを用いた小核試験で陽性³⁾との報告があった。O,O-diethyl S-[(ethylthio)methyl] esterについてはCHO細胞を用いた染色体異常試験で陰性⁴⁾、ラット小核試験で陽性⁵⁾との報告があった。また、diethyl dithiophosphate ammonium saltおよびdiethyl dithiophosphate potassium saltの遺伝毒性に関する報告はなかった。

文献

- 1) Maron DM, Ames BN:Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113:173-215(1983).
- 2) Green MH, Muriel WJ:Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res.*, 38:3-32(1978).
- 3) Ni Z, Li S, Liu Y, Tang Y, Pang D:Induction of micronucleus by organophosphorus pesticides both in vivo and in vitro. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 24:82-86(1993).
- 4) Lin MF, Wu CL, Wang TC:Pesticide clastogenicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.*, 188:241-250(1987).
- 5) Grover IS, Malhi PK:Genotoxic effects of some organophosphorous pesticides. I. Induction of micronuclei in bone marrow cells in rat. *Mutation Res.*, 155:131-134(1985).

連絡先

試験責任者：中嶋 圓
試験担当者：永井美穂，田中 仁，
古屋有佳子，仲村渠奈美子，
赤星まゆみ，尾崎伸也，
菊池正憲
(財)食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)
Miho Nagai, Jin Tanaka,
Yukako Furuya, Namiko Nakandakari,
Mayumi Akahoshi, Shin-ya Ozaki,
Masanori Kikuchi
Biosafety Research Center, Foods, Drugs
and Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shioshindan, Fukude-cho, Iwata-gun,
Shizuoka, 437-1213, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

復帰変異試験

Table 1 Summary data of dose-finding study with *O,O'*-diethyl dithiophosphate [non-activation method:-S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98					
DMSO ^a	0	89 [84 \pm 8]	87 [84 \pm 8]	75 [84 \pm 8]	11 [11 \pm 2]	9 [11 \pm 2]	12 [11 \pm 2]	29 [23 \pm 6]	18 [23 \pm 6]	22 [23 \pm 6]	27 [22 \pm 5]	21 [22 \pm 5]	17 [22 \pm 5]	9 [8 \pm 1]	7 [8 \pm 1]	8 [8 \pm 1]
Test substance	2.29	66 [69 \pm 7]	64 [69 \pm 7]	77 [69 \pm 7]	13 [12 \pm 2]	10 [12 \pm 2]	14 [12 \pm 2]	25 [22 \pm 3]	20 [22 \pm 3]	20 [22 \pm 3]	17 [20 \pm 3]	20 [20 \pm 3]	23 [20 \pm 3]	13 [9 \pm 4]	9 [9 \pm 4]	5 [9 \pm 4]
	6.86	78 [83 \pm 8]	80 [83 \pm 8]	92 [83 \pm 8]	20 [19 \pm 1]	18 [19 \pm 1]	19 [19 \pm 1]	21 [18 \pm 4]	18 [18 \pm 4]	14 [18 \pm 4]	11 [20 \pm 9]	21 [20 \pm 9]	29 [20 \pm 9]	7 [9 \pm 3]	12 [9 \pm 3]	8 [9 \pm 3]
	20.6	107 [102 \pm 7]	104 [102 \pm 7]	94 [102 \pm 7]	30 [25 \pm 6]	19 [25 \pm 6]	27 [25 \pm 6]	33 [27 \pm 7]	20 [27 \pm 7]	28 [27 \pm 7]	22 [20 \pm 2]	19 [20 \pm 2]	20 [20 \pm 2]	10 [9 \pm 2]	10 [9 \pm 2]	6 [9 \pm 2]
	61.7	122 [117 \pm 5]	117 [117 \pm 5]	112 [117 \pm 5]	67 [74 \pm 16]	93 [74 \pm 16]	63 [74 \pm 16]	27 [28 \pm 4]	24 [28 \pm 4]	32 [28 \pm 4]	20 [20 \pm 0]	20 [20 \pm 0]	20 [20 \pm 0]	6 [7 \pm 3]	5 [7 \pm 3]	10 [7 \pm 3]
	185	164 [153 \pm 18]	163 [153 \pm 18]	133 [153 \pm 18]	155 [147 \pm 7]	145 [147 \pm 7]	142 [147 \pm 7]	29 [30 \pm 1]	30 [30 \pm 1]	31 [30 \pm 1]	17 [16 \pm 3]	18 [16 \pm 3]	12 [16 \pm 3]	3 [3 \pm 0]	3 [3 \pm 0]	3 [3 \pm 0]
	556	199* [187 \pm 12]	186* [187 \pm 12]	176* [187 \pm 12]	495 [504 \pm 34]	475 [504 \pm 34]	541 [504 \pm 34]	41 [44 \pm 6]	50 [44 \pm 6]	40 [44 \pm 6]	16 [19 \pm 3]	18 [19 \pm 3]	22 [19 \pm 3]	2 [3 \pm 1]	3 [3 \pm 1]	3 [3 \pm 1]
	1667	168* [155 \pm 16]	161* [155 \pm 16]	137* [155 \pm 16]	425 [497 \pm 82]	587 [497 \pm 82]	480 [497 \pm 82]	55 [41 \pm 13]	35 [41 \pm 13]	32 [41 \pm 13]	19 [20 \pm 3]	18 [20 \pm 3]	23 [20 \pm 3]	2* [3 \pm 1]	3* [3 \pm 1]	4* [3 \pm 1]
	5000+	0* [0 \pm 0]	0* [0 \pm 0]	0* [0 \pm 0]	66* [67 \pm 10]	77* [67 \pm 10]	57* [67 \pm 10]	40* [35 \pm 5]	36* [35 \pm 5]	30* [35 \pm 5]	8* [13 \pm 4]	16* [13 \pm 4]	14* [13 \pm 4]	0* [0 \pm 0]	0* [0 \pm 0]	0* [0 \pm 0]
Positive control		372 [341 \pm 32]	308 [341 \pm 32]	342 ^b [341 \pm 32]	560 [550 \pm 21]	565 [550 \pm 21]	526 ^d [550 \pm 21]	109 [100 \pm 8]	96 [100 \pm 8]	94 ^b [100 \pm 8]	562 [612 \pm 56]	672 [612 \pm 56]	603 ^d [612 \pm 56]	370 [331 \pm 34]	318 [331 \pm 34]	305 ^c [331 \pm 34]

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*: Growth inhibition was observed

Table 2 Summary data of dose-finding study with *O,O'-diethyl dithiophosphate*
[activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO ^a	0	101 [103 \pm 5]	99 [10 \pm 4]	108 [22 \pm 3]	8 [30 \pm 2]	14 [22 \pm 2]	7 [20 \pm 2]	19 [36 \pm 3]	24 [38 \pm 2]	22 [34 \pm 2]	30 [35 \pm 6]	32 [31 \pm 6]	28 [23 \pm 3]	23 [22 \pm 2]	20 [21 \pm 2]	24 [21 \pm 2]
Test substance	2.29	105 [100 \pm 6]	101 [7 \pm 4]	93 [7 \pm 4]	11 [27 \pm 8]	7 [36 \pm 2]	4 [36 \pm 2]	31 [23 \pm 2]	32 [27 \pm 2]	17 [25 \pm 2]	36 [37 \pm 13]	38 [35 \pm 13]	34 [31 \pm 13]	18 [17 \pm 4]	28 [24 \pm 4]	21 [18 \pm 5]
	6.86	85 [90 \pm 5]	94 [8 \pm 2]	92 [8 \pm 2]	8 [22 \pm 2]	10 [22 \pm 2]	7 [20 \pm 2]	23 [23 \pm 5]	24 [27 \pm 5]	20 [27 \pm 5]	51 [37 \pm 13]	34 [35 \pm 13]	25 [25 \pm 13]	17 [17 \pm 4]	24 [20 \pm 4]	18 [18 \pm 4]
	20.6	100 [111 \pm 15]	128 [10 \pm 3]	105 [10 \pm 3]	9 [23 \pm 5]	8 [23 \pm 5]	14 [23 \pm 5]	24 [27 \pm 5]	27 [27 \pm 5]	17 [27 \pm 5]	42 [36 \pm 6]	32 [32 \pm 6]	31 [31 \pm 6]	21 [21 \pm 3]	21 [21 \pm 3]	26 [23 \pm 3]
	61.7	93 [102 \pm 12]	116 [12 \pm 6]	98 [12 \pm 6]	19 [27 \pm 6]	10 [25 \pm 6]	7 [25 \pm 6]	27 [27 \pm 6]	18 [27 \pm 6]	30 [27 \pm 6]	36 [36 \pm 7]	26 [34 \pm 7]	39 [34 \pm 7]	12 [12 \pm 6]	24 [19 \pm 6]	22 [19 \pm 6]
	185	102 [95 \pm 7]	89 [12 \pm 2]	95 [12 \pm 2]	13 [22 \pm 4]	9 [22 \pm 4]	13 [22 \pm 4]	26 [27 \pm 4]	20 [27 \pm 4]	19 [27 \pm 4]	37 [32 \pm 4]	29 [32 \pm 4]	30 [32 \pm 4]	26 [26 \pm 5]	19 [21 \pm 5]	17 [19 \pm 5]
	556	90 [86 \pm 5]	88 [58 \pm 6]	81 [58 \pm 6]	58 [53 \pm 6]	46 [53 \pm 6]	55 [53 \pm 6]	25 [25 \pm 5]	30 [25 \pm 5]	20 [25 \pm 5]	35 [37 \pm 2]	39 [37 \pm 2]	37 [37 \pm 2]	19 [19 \pm 0]	19 [19 \pm 0]	19 [19 \pm 0]
	1667	166* [147 \pm 17]	133* [219 \pm 12]	143* [31 \pm 6]	212 [31 \pm 6]	212 [31 \pm 6]	232 [31 \pm 6]	27 [30 \pm 2]	38 [30 \pm 2]	27 [30 \pm 2]	28 [30 \pm 2]	32 [30 \pm 2]	30 [30 \pm 2]	12 [12 \pm 2]	14 [12 \pm 2]	10 [12 \pm 2]
	5000+	192* [181 \pm 11]	181* [172 \pm 29]	171* [172 \pm 29]	198 [172 \pm 29]	177 [172 \pm 29]	141 [172 \pm 29]	30 [27 \pm 3]	25 [27 \pm 3]	26 [27 \pm 3]	32 [31 \pm 6]	25 [31 \pm 6]	37 [31 \pm 6]	11* [11 \pm 3]	15* [15 \pm 3]	16* [14 \pm 3]
Positive control		790 [815 \pm 38]	795 [803 \pm 25]	859 ^b [803 \pm 25]	275 [2006 \pm 88]	310 [330 \pm 21]	323 ^c [330 \pm 21]	924 [924 \pm 88]	1099 [1099 \pm 88]	994 ^d [994 \pm 88]	355 [355 \pm 21]	320 [320 \pm 21]	316 ^e [316 \pm 21]	155 [155 \pm 8]	139 [139 \pm 8]	143 ^d [143 \pm 8]

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*: Growth inhibition was observed

復帰変異試験

Table 3 Results of the bacterial reversion assay of *O,O'*-diethyl dithiophosphate [non-activation method:-S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]											
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98		
DMSO ^a	0	126 [110 \pm 15]	97 [22 \pm 5]	107 [32 \pm 2]	25 [34 \pm 3]	16 [30 \pm 2]	25 [33 \pm 3]	34 [24 \pm 7]	30 [25 \pm 7]	33 [16 \pm 6]	30 [5 \pm 1]	25 [5 \pm 1]	16 [4 \pm 1]
Test substance	9.77				27 [32 \pm 6]	31 [45 \pm 14]	39 [78 \pm 4]						
	19.5				53 [137 \pm 14]	53 [78 \pm 4]	29 [45 \pm 14]						
	39.1	143 [137 \pm 14]	146 [137 \pm 14]	121 [137 \pm 14]	74 [78 \pm 4]	81 [78 \pm 4]	80 [78 \pm 4]						
	78.1	183 [166 \pm 15]	162 [166 \pm 15]	154 [166 \pm 15]	114 [115 \pm 6]	122 [115 \pm 6]	110 [115 \pm 6]						
	156	188 [176 \pm 12]	176 [176 \pm 12]	164 [176 \pm 12]	145 [145 \pm 7]	152 [145 \pm 7]	139 [145 \pm 7]	33 [36 \pm 3]	36 [36 \pm 3]	38 [36 \pm 3]	25 [31 \pm 7]	38 [31 \pm 7]	29 [7 \pm 2]
	313	222* [200 \pm 48]	234* [200 \pm 48]	145* [200 \pm 48]	310 [321 \pm 103]	429 [321 \pm 103]	223 [321 \pm 103]	41 [39 \pm 3]	40 [39 \pm 3]	35 [39 \pm 3]	19 [26 \pm 6]	29 [26 \pm 6]	31 [3 \pm 1]
	625	340* [348 \pm 15]	339* [348 \pm 15]	366* [348 \pm 15]	741 [724 \pm 38]	680 [724 \pm 38]	751 [724 \pm 38]	50 [52 \pm 5]	58 [52 \pm 5]	49 [52 \pm 5]	17 [21 \pm 5]	20 [21 \pm 5]	26 [6 \pm 3]
	1250	294* [342 \pm 42]	371* [342 \pm 42]	362* [342 \pm 42]				44 [50 \pm 5]	53 [50 \pm 5]	52 [50 \pm 5]	12* [12 \pm 2]	14* [12 \pm 2]	11* [5 \pm 4]
	2500+	0* [0 \pm 0]	0* [0 \pm 0]	0* [0 \pm 0]				35 [33 \pm 2]	32 [33 \pm 2]	32 [33 \pm 2]	11* [10 \pm 1]	9* [10 \pm 1]	11* [0 \pm 0]
	5000+							33* [28 \pm 5]	24* [28 \pm 5]	27* [28 \pm 5]	6* [6 \pm 1]	7* [6 \pm 1]	6* [6 \pm 1]
Positive control		560 [580 \pm 18]	596 [609 \pm 18]	584 ^b [609 \pm 18]	619 [609 \pm 18]	619 [609 \pm 18]	588 ^d [609 \pm 18]	130 [123 \pm 7]	121 [123 \pm 7]	117 ^b [123 \pm 7]	645 [658 \pm 17]	677 [658 \pm 17]	651 ^d [658 \pm 17]
											310 [321 \pm 29]	354 [321 \pm 29]	298 ^e [321 \pm 29]

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 9-AA; 9-Aminooacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*: Growth inhibition was observed

Table 4 Results of the bacterial reversion assay of O,O'-diethyl dithiophosphate
[activation method:+S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 uvrA			TA98			TA1537		
DMSO ^a	0	121	84	92	17	13	17	24	26	25	24	33	33	19	22	21
		[99 \pm 19]			[16 \pm 2]			[25 \pm 1]			[30 \pm 5]			[21 \pm 2]		
Test substance	78.1	96	129	118	20	23	18									
		[114 \pm 17]			[20 \pm 3]											
	156	115	102	101	12	20	20	14	38	24	33	34	42	20	27	27
		[106 \pm 8]			[17 \pm 5]			[25 \pm 12]			[36 \pm 5]			[25 \pm 4]		
	313	92	102	106	19	25	16	21	18	26	18	36	34	25	21	16
		[100 \pm 7]			[20 \pm 5]			[22 \pm 4]			[29 \pm 10]			[21 \pm 5]		
	625	83*	103*	98*	41	30	26	18	17	34	42	32	31	8	14	17
		[95 \pm 10]			[32 \pm 8]			[23 \pm 10]			[35 \pm 6]			[13 \pm 5]		
	1250 +	99*	104*	118*	117	105	121	28	33	30	25	38	18	8	5	6
		[107 \pm 10]			[114 \pm 8]			[30 \pm 3]			[27 \pm 10]			[6 \pm 2]		
	2500 +	65*	115*	81*	161	150	141	23	38	39	41	24	33	5*	6*	6*
		[87 \pm 26]			[151 \pm 10]			[33 \pm 9]			[33 \pm 9]			[6 \pm 1]		
	5000 +	111*	94*	127*	159	169	148	35	32	27	34	38	37	0*	2*	4*
		[111 \pm 17]			[159 \pm 11]			[31 \pm 4]			[36 \pm 2]			[2 \pm 2]		
Positive control		858	764	796 ^b	314	343	322 ^c	975	728	788 ^d	355	370	347 ^e	239	247	194 ^d
		[806 \pm 48]			[326 \pm 15]			[830 \pm 129]			[357 \pm 12]			[227 \pm 29]		

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+: Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*: Growth inhibition was observed

復帰変異試験

Table 5 Results of the bacterial reversion assay of *O,O'*-diethyl dithiophosphate (restudy)
[non-activation method:-S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]													
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98				
DMSO ^a	0	88 [97 \pm 8]	99 [10 \pm 1]	103 [27 \pm 6]	11 [10 \pm 1]	10 [20 \pm 6]	9 [13 \pm 1]	33 [22 \pm 6]	22 [27 \pm 6]	27 [25 \pm 6]	25 [13 \pm 6]	13 [22 \pm 6]	11 [11 \pm 1]		
Test substance	9.77				9 [10 \pm 2]										
	19.5	105 [107 \pm 5]	104 [21 \pm 4]	113 [119 \pm 15]	20 [44 \pm 11]	26 [54 \pm 11]	18 [65 \pm 11]					8 [6 \pm 2]	5 [4 \pm 2]	4 [7 \pm 2]	
	39.1	121 [119 \pm 15]	133 [54 \pm 11]	103 [123 \pm 7]	44 [131 \pm 11]	54 [119 \pm 11]	65 [118 \pm 11]					21 [21 \pm 1]	21 [20 \pm 2]	20 [12 \pm 11]	
	78.1	153 [159 \pm 19]	181 [123 \pm 7]	144 [159 \pm 19]	131 [131 \pm 7]	119 [123 \pm 7]	118 [118 \pm 7]					19 [20 \pm 2]	22 [10 \pm 3]	20 [11 \pm 6]	
	156	172 [172 \pm 2]	170 [219 \pm 14]	173 [219 \pm 14]	235 [29 \pm 2]	216 [29 \pm 2]	207 [29 \pm 2]	31 [18 \pm 6]	28 [18 \pm 6]	27 [18 \pm 6]	18 [18 \pm 6]	23 [8 \pm 3]	12 [5 \pm 3]	11 [5 \pm 5]	
	313	167* [177 \pm 8]	181* [472 \pm 33]	182* [472 \pm 33]	496 [32 \pm 1]	486 [32 \pm 1]	434 [32 \pm 1]	32 [18 \pm 6]	31 [18 \pm 6]	32 [18 \pm 6]	14 [15 \pm 1]	25 [9* \pm 6*]	15 [6* \pm 2]	5* [5* \pm 5*]	
	625	313* [324 \pm 17]	315* [1067 \pm 22]	344* [1067 \pm 22]	1066 [50 \pm 4]	1089 [50 \pm 4]	1045 [50 \pm 4]	50 [20 \pm 3]	54 [20 \pm 3]	47 [20 \pm 3]	19 [6 \pm 1]	23 [6 \pm 1]	18 [6 \pm 1]	6* [6* \pm 6*]	
	1250	435* [454 \pm 19]	454* [454 \pm 10]	473* [57 \pm 10]				59 [57 \pm 4]	65 [57 \pm 4]	46 [57 \pm 4]	22 [25 \pm 4]	29 [25 \pm 4]	25 [5* \pm 5*]	5* [4 \pm 2]	
	2500 +							42 [43 \pm 8]	51 [43 \pm 8]	35 [43 \pm 8]	13* [11 \pm 2]	9* [11 \pm 2]	10* [10 \pm 2]		
	5000 +							47* [38 \pm 9]	39* [38 \pm 9]	29* [38 \pm 9]	4* [6 \pm 2]	7* [6 \pm 2]	6* [6 \pm 2]		
Positive control		387 [424 \pm 33]	435 [636 \pm 22]	449 ^{b)} [636 \pm 22]	659 [132 \pm 20]	615 [132 \pm 20]	635 ^{c)} [132 \pm 20]	154 [114 \pm 10]	127 [114 \pm 10]	114 ^{b)} [114 \pm 10]	652 [627 \pm 35]	587 [627 \pm 35]	642 ^{d)} [304 \pm 55]	350 [304 \pm 55]	243 [320 \pm 10]

^a: Negative control(Dimethyl sulfoxide)^b: AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ^d: AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*:Growth inhibition was observed

Table 6 Results of the bacterial reversion assay of O,O'-diethyl dithiophosphate (restudy)
[activation method:+S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO ^a	0	102 [97 \pm 5]	92 [97 \pm 5]	96 [97 \pm 5]	11 [10 \pm 2]	7 [7 \pm 1]	11 [10 \pm 2]	30 [26 \pm 4]	23 [26 \pm 4]	26 [26 \pm 4]	31 [30 \pm 2]	30 [30 \pm 2]	28 [28 \pm 2]	11 [11 \pm 5]	21 [21 \pm 5]	15 [15 \pm 5]
Test substance	39.1	108 [94 \pm 17]	75 [94 \pm 17]	100 [94 \pm 17]												
	78.1	121 [103 \pm 15]	95 [103 \pm 15]	94 [103 \pm 15]	11 [13 \pm 3]	12 [13 \pm 3]	17 [13 \pm 3]							12 [11 \pm 7]	17 [11 \pm 7]	4 [4 \pm 4]
	156	107 [98 \pm 9]	96 [98 \pm 9]	90 [98 \pm 9]	9 [10 \pm 1]	11 [10 \pm 1]	9 [10 \pm 1]	24 [26 \pm 2]	25 [26 \pm 2]	28 [26 \pm 2]	25 [24 \pm 7]	30 [24 \pm 7]	17 [17 \pm 7]	13 [10 \pm 6]	14 [10 \pm 6]	4 [4 \pm 4]
	313	101 [94 \pm 6]	92 [94 \pm 6]	89 [94 \pm 6]	13 [17 \pm 4]	19 [17 \pm 4]	20 [17 \pm 4]	40 [30 \pm 9]	27 [30 \pm 9]	23 [25 \pm 2]	25 [25 \pm 2]	25 [25 \pm 2]	27 [25 \pm 2]	9 [7 \pm 2]	8 [7 \pm 2]	5 [5 \pm 2]
	625	95 [92 \pm 6]	86 [92 \pm 6]	96 [92 \pm 6]	47 [47 \pm 1]	46 [47 \pm 1]	48 [47 \pm 1]	20 [23 \pm 2]	24 [23 \pm 2]	24 [23 \pm 2]	32 [27 \pm 4]	25 [27 \pm 4]	25 [27 \pm 4]	2 [4 \pm 2]	4 [4 \pm 2]	6 [6 \pm 2]
	1250+	91* [102 \pm 17]	122* [102 \pm 17]	94* [102 \pm 17]	235 [235 \pm 3]	232 [235 \pm 3]	237 [235 \pm 3]	30 [29 \pm 5]	23 [29 \pm 5]	33 [29 \pm 5]	25 [28 \pm 4]	26 [28 \pm 4]	32 [28 \pm 4]	7 [7 \pm 2]	9 [7 \pm 2]	6 [6 \pm 2]
	2500+	278* [284 \pm 11]	277* [284 \pm 11]	297* [284 \pm 11]	357 [332 \pm 22]	319 [332 \pm 22]	320 [332 \pm 22]	38 [35 \pm 6]	40 [35 \pm 6]	28 [35 \pm 6]	23 [26 \pm 4]	31 [26 \pm 4]	25 [26 \pm 4]	11* [9 \pm 2]	9* [9 \pm 2]	8* [8 \pm 2]
	5000+	212* [199 \pm 15]	182* [199 \pm 15]	203* [199 \pm 15]	226 [231 \pm 8]	226 [231 \pm 8]	240 [231 \pm 8]	32 [28 \pm 4]	29 [28 \pm 4]	24 [28 \pm 4]	36 [29 \pm 7]	22 [29 \pm 7]	30 [29 \pm 7]			
Positive control		847 [928 \pm 71]	981 [928 \pm 71]	955 ^b [928 \pm 71]	329 [308 \pm 18]	295 [308 \pm 18]	301 ^c [308 \pm 18]	899 [880 \pm 24]	853 [880 \pm 24]	888 ^d [880 \pm 24]	310 [305 \pm 11]	312 [305 \pm 11]	292 ^e [305 \pm 11]	141 [162 \pm 22]	162 [162 \pm 22]	184 ^e [162 \pm 22]

^aNegative control (Dimethyl sulfoxide)^b2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ^c2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ^d2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ^e2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

*:Growth inhibition was observed

O,O'-ジエチルジチオリン酸の チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of O,O'-Diethyl dithiophosphate in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

*O,O'-ジエチルジチオリン酸*の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、短時間処理法S9 mix 非存在下では240 µg/mLを最高処理濃度とした19.8～240 µg/mLの濃度範囲で8用量を、S9 mix 存在下では240 µg/mLを最高処理濃度とした28.2～240 µg/mLの濃度範囲で7用量を設定した。S9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。S9 mix 非存在下では82.3, 118, 168 µg/mL, S9 mix 存在下では118, 168, 240 µg/mLのそれぞれ3用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、-S9処理および+S9処理とも溶媒対照群と比較して、統計学的に有意な染色体異常の誘発が認められた。しかしながら、弱い陽性反応であったことから連続処理法24時間処理による試験を追加して実施した。175 µg/mLを最高処理濃度とした29.4～175 µg/mLの濃度範囲で9用量を設定した。S9 mix非存在下における24時間連続処理後、標本を作製し、112, 140 および175 µg/mLの3用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、統計学的に有意な染色体異常の誘発が認められ、かつ、いずれの処理においても用量に依存した増加であった。

以上の結果より、本試験条件下では*O,O'-ジエチルジチオリン酸*は、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受け、ジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK KGaA)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を融解し3～5日ごとに継代したものを使用した。なお、細胞増殖抑制試験では継代数11、染色体異常試験(短時間処理法)では同15、染色体異常試験(連続処理法)では同6の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(旭テクノグラス)に、非働化(56°C, 30分)済み仔牛血清(Invitrogen)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液は冷暗所(4°C)に保存した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(三洋電機バイオメディカ)を用い、CO₂濃度5%，37°Cの条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製した。また、S9 mixの組成は松岡らの方法¹⁾に従った。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 µmol
KCl	33 µmol
G-6-P	5 µmol
NADP	4 µmol
HEPES 緩衝液(pH 7.2)	4 µmol
蒸留水	0.1 mL

5. 被験物質

被験物質の*O,O'-ジエチルジチオリン酸*(ロット番号:TCQ2466)は純度95.1%の暗灰褐色透明の液体で、DMSOに易溶である。和光純薬工業(静岡)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷蔵で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

試験の都度、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSOで被験物質を溶解し、調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。

7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

12 ウエルの細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。短時間処理法

ではS9 mix非存在下(-S9処理)あるいは存在下(+S9処理)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。連続処理法の場合、24時間連続して処理を実施した。

細胞を10 vol%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業)で固定した後、0.1 w/v%クリスタル・バイオレット(関東化学)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30 vol%エタノール、1 vol%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、分光光度計(105-50型:日立製作所)を用いて580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、すなわち相対細胞増殖率を算出し、さらにプロビット法を用いて50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

その結果、細胞増殖を50%抑制する濃度は、短時間処理法-S9処理で88.4 µg/mL、同+S9処理で117 µg/mL、連続処理法24時間処理で77.2 µg/mLと算出された(Fig. 1~2)。

被験物質処理開始時、すべての処理法において233 µg/mL以上の用量で白色粉末状等の析出が観察された。さらに、931 µg/mL以上で培養液のpH低下が認められた。被験物質処理終了時においても466 µg/mL以上の用量では白色粉末状等の析出が観察された。ただし、培養液のpHは中性域を示していた。

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに、染色体異常試験では短時間処理法-S9処理および+S9処理とも240 µg/mLを

最高処理濃度とし、以下それぞれ公比1.43で減じた8または7用量ならびに溶媒対照群を設定した。また、短時間処理法において弱い陽性反応が認められたことから、連続処理法24時間処理を実施し、175 µg/mLを最高処理濃度とし、以下公比1.25で減じた9用量および溶媒対照群を設定した。

なお、陽性対照として、短時間処理の場合、-S9処理でマイトマイシンC(MMC:協和醣酵工業)を0.1 µg/mL、+S9処理でシクロホスファミド(CP:塩野義製薬)を12.5 µg/mLの用量で、連続処理の場合MMCを0.05 µg/mLの用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、細胞増殖抑制試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2 µg/mLとなるようコルセミド(Invitrogen)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.2 vol%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的変化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切斷

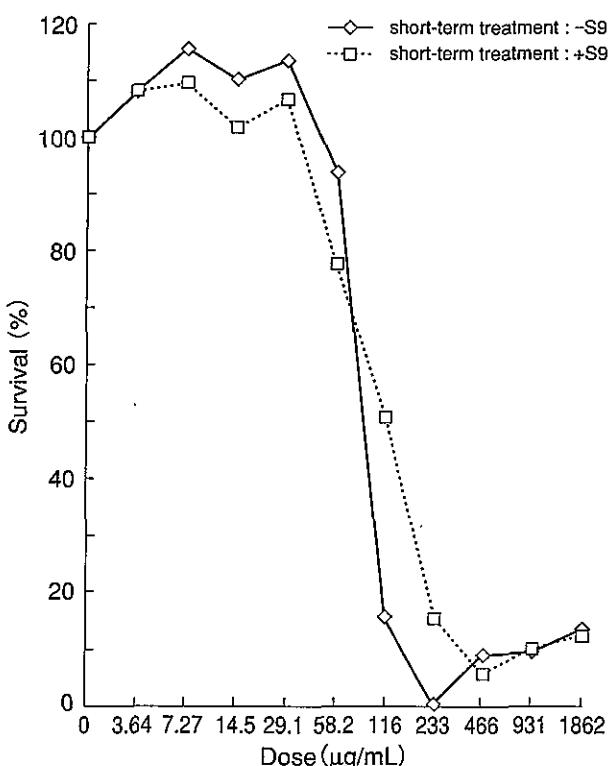


Fig. 1 Growth inhibition of CHL cells treated with *O,O'*-diethyl dithiophosphate [short-term treatment: 6 hr]

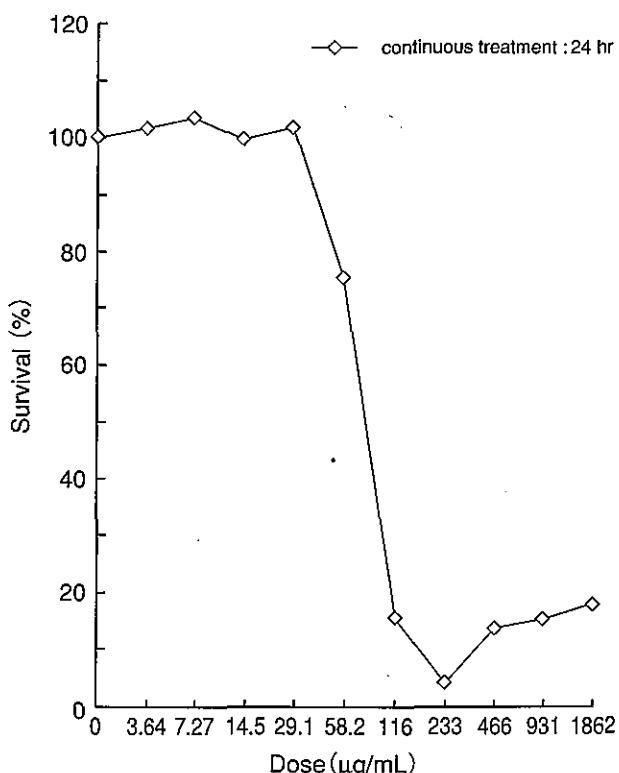


Fig. 2 Growth inhibition of CHL cells treated with *O,O'*-diethyl dithiophosphate [continuous treatment: 24 hr]

(csb), 染色分体交換(cte), 染色体交換(cse)およびその他(oth)の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会による分類法²⁾に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、染色体分析を実施した。

11. 結果の解析

ギャップを含めない場合(-gap)について染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、Fisherの直接確率計算法(有意水準0.05)を用いて検定した。また用量依存性については、Cochran Armitageの傾向検定(有意水準0.05)を用いて検定した。溶媒対照群と比較し被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物的な妥当性も考慮して行った。

また、分裂中期像の20%にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であるD₂₀値を最小二乗法により算出し、一定濃度(mg/mL)あたりの交換型異常(cte)出現数を示す比較値であるTR値を、染色分体交換の出現頻度(%)を被験物質濃度(mg/mL換算)で割ることにより算出した。

12. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に各プレートの低張処理した細胞液を一定量採取し、ATP測定用試薬キット(ルシフェール250:キッコーマン)およびATPフォトメーター(ルミスターC-100LU:キッコーマン)を用いて相対発光量(Relatiye Light Unit:RLU)を求めATP含量を測定した。陰性対照群におけるRLUに対する比(=相対細胞増殖率)を各用量群について求め、細胞増殖抑制度とした。

結果および考察

短時間処理法での試験結果をTable 1~2に示した。*O,O'-ジエチルジチオリン酸*処理群の場合、染色体構造異常出現頻度は、-S9処理では82.3 μg/mLで3.5%(p≤0.05), 118 μg/mLで5.0%(p≤0.05), 168 μg/mLで8.0%(p≤0.05)を示した。+S9処理では118 μg/mLで2.5%, 168 μg/mLで6.5%(p≤0.05), 240 μg/mLで7.0%(p≤0.05)を示し、用量依存性(p≤0.05)も確認された。倍数性細胞の出現頻度については、-S9処理の168 μg/mLにおいて統計学的に有意な増加が認められたが、背景データによる基準値内であったことから陰性反応と判断した。また、-S9処理ならびに+S9処理とも試験用量に依存した相対細胞増殖率の減少が観察され、-S9処理では染色体構造異常評価群中の高用量である168 μg/mLでの相対細胞増殖率が22.8%であった。最高用量の240 μg/mLでの相対細胞増殖率は3.1%であった。+S9処理

では染色体構造異常評価群中の高用量である240 μg/mLでの相対細胞増殖率は47.2%であった。一方、S9 mix非存在下における陽性対照物質MMCで処理した細胞、およびS9 mix存在下における陽性対照物質CPで処理した細胞では染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

*O,O'-ジエチルジチオリン酸*における-S9処理および+S9処理での結果は、いずれも弱い陽性反応であったことから、連続処理法24時間処理による染色体構造異常試験を追加して実施し、結果をTable 3に示した。*O,O'-ジエチルジチオリン酸*処理群での染色体構造異常出現頻度は、112 μg/mLで2.5%, 140 μg/mLで4.5%(p≤0.05), 175 μg/mLで9.0%(p≤0.05)を示し、用量依存性(p≤0.05)も確認された。倍数性細胞の誘発傾向はいずれの用量においても観察されなかった。また、試験用量に依存した相対細胞増殖率の減少が観察され、染色体構造異常評価群中の高用量である175 μg/mLでの相対細胞増殖率は34.9%であった。一方、陽性対照物質MMCで処理した細胞では染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

変異原性の強さに関する相対的比較値であるD₂₀値の最小値は0.404(mg/mL), TR値の最大値は37.1(mg当たり)と算出された。なお、被験物質処理開始時、短時間処理法-S9処理、同+S9処理の240 μg/mLにおいてのみ白色粉末状の析出が観察された。被験物質処理終了時ではpHの変動、被験物質析出等の特筆すべき変化は、いずれの用量においても観察されなかった。

以上の試験結果から、本試験条件下において*O,O'-ジエチルジチオリン酸*のチャイニーズ・ハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陽性と判定した。

なお、本被験物質(*O,O'-ジエチルジチオリン酸*)について、遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった。類縁体である*O,O-diethyl S-[2-(ethylthio)ethyl] ester*についてCHL細胞を用いたin vitro小核ならびにマウスを用いた小核試験で陽性³⁾との報告があった。*O,O-diethyl S-[2-(ethylthio)methyl] ester*についてはCHO細胞を用いた染色体構造異常試験で陰性⁴⁾、ラット小核試験で陽性⁵⁾との報告があった。また、diethyl dithiophosphate ammonium saltおよびdiethyl dithiophosphate potassium saltの遺伝毒性に関する報告はなかった。

文献

- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. Mutation Res, 66:277-290(1979).
- 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(編):「化学物質による染色体異常アトラス」朝倉書店、東京(1988)pp. 31-35.
- Ni Z, Li S, Liu Y, Tang Y, Pang D: Induction of micronucleus by organophosphorus pesticides both in vivo and in vitro. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao, 24:82-86(1993).

- 4) Lin MF, Wu CL, Wang TC:Pesticide clastogenicity in Chinese hamster ovary cells. Mutation Res, 188:241-250(1987).
- 5) Grover IS, Malhi PK:Genotoxic effects of some organophosphorous pesticides. I. Induction of micronuclei in bone marrow cells in rat. Mutation Res, 155:131-134(1985).

連絡先

試験責任者：中嶋 圓

試験担当者：永井美穂，仲村渠奈美子，

尾崎伸也，嶋田佐和子，

菊池正憲，古屋有佳子，

鈴木ゆみ子，鈴木雅也

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)

Miho Nagai, Namiko Nakandakari,

Shin-ya Ozaki, Sawako Shimada,

Masanori Kikuchi, Yukako Furuya,

Yumiko Suzuki, Masaya Suzuki

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshindien, Fukude-cho, Iwata-gun,
Shizuoka, 437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

染色体異常試験

Table 1 Chromosome aberration test on CHL cells treated with *O,O'*-diethyl dithiophosphate [short-term treatment: -S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO ^a	0	6	100.0	200	2	0	1	0	0	0	1(0.5) #	200	0(0.0) #	
Test substance	82.3	6	93.2	200	0	5	1	1	0	0	7(3.5)*	200	0(0.0)	
	118	6	63.2	200	4	2	8	0	0	0	10(5.0)*	200	1(0.5)	
	168	6	22.8	200	6	9	9	0	0	0	16(8.0)*	200	6(3.0)*	Positive
	240	6	3.1	Toxic										
MMC ^b	0.1	6	99.8	200	9	34	59	1	0	0	81(40.5)*	200	2(1.0)	

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) Positive control (Mitomycin C)

* p≤0.05: Significant difference from the negative control group (Fisher's exact test)

p≤0.05: Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

Table 2 Chromosome aberration test on CHL cells treated with *O,O'*-diethyl dithiophosphate [short-term treatment: +S9 mix]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO ^a	0	6	100.0	200	3	0	1	0	0	0	1(0.5) #	200	1(0.5)	
Test substance	118	6	87.8	200	2	2	3	0	0	0	5(2.5)	200	5(2.5)	
	168	6	59.8	200	2	6	8	0	0	0	13(6.5)*	200	5(2.5)	
	240	6	47.2	200	3	3	11	1	0	0	14(7.0)*	200	5(2.5)	Positive
CP ^b	12.5	6	122.0	200	6	16	52	1	0	0	66(33.0)*	200	0(0.0)	

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) Positive control (Cyclophosphamide)

* p≤0.05: Significant difference from the negative control group (Fisher's exact test)

p≤0.05: Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

Table 3 Chromosome aberration test on CHL cells treated with O,O'-diethyl dithiophosphate
[continuous treatment: 24 hr]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap (%)	Number of cells analyzed for polyplloid	Number of polyplloid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO ^a	0	24	100.0	200	3	0	1	0	0	0	1(0.5) #	200	2(1.0)	Positive
	112	24	102.5	200	5	2	4	0	0	0	5(2.5)	200	3(1.5)	
	140	24	66.6	200	2	3	6	1	0	0	9(4.5)*	200	1(0.5)	
	175	24	34.9	200	4	6	13	0	0	0	18(9.0)*	200	2(1.0)	
MMC ^b	0.05	24	127.1	200	12	13	35	0	0	0	46(23.0)*	200	0(0.0)	

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control (Dimethyl sulfoxide)

b) Positive control (Mitomycin C)

* $p \leq 0.05$: Significant difference from the negative control group (Fisher's exact test)# $p \leq 0.05$: Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

3. 試験実施概要

3.1 表題

クロロシクロヘキサンのラットを用いた経口投与による急性毒性試験

3.2 試験番号

B041793

3.3 試験目的

クロロシクロヘキサンをラットに経口投与し、その急性毒性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

OECD ガイドライン No. 423, December 17, 2001

3.5 適用 GLP

OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」

(厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 15 年 11 月 21 日)

3.6 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室

東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所

東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

茨城県神栖市砂山 14 番地

3.9 試験責任者

星野 信人

株式会社三菱化学安全科学研究所

鹿島研究所 安全性第 2 研究部

茨城県神栖市砂山 14 番地

5. 要約

クロロシクロヘキサンを OECD テストガイドライン (TG) 423 に従って 8~9 週齢の SD 系雌ラット (Crl:CD(SD)) に強制経口投与し、その急性経口毒性を検討した。投与用量は第 1 回および 2 回投与を 300 mg/kg、第 3 回および 4 回投与を 2000 mg/kg とした。クロロシクロヘキサンをオリブ油で溶解調製し、投与前日の夕方から絶食したラットに 5 mL/kg の液量で投与した。

第 1 回～4 回投与群の 300 および 2000 mg/kg の用量いずれにも、死亡例はなく、一般状態および剖検に異常は認められなかった。2000 mg/kg では体重増加の抑制や減少がみられたが投与第 8 日には回復した。

本試験条件下におけるクロロシクロヘキサンの概略の半数致死量は、2000 mg/kg 以上、Globally Harmonized Classification System (GHS) は Category 5 (>2000-5000 mg/kg b.w.) に分類された。

6. 緒言

クロロシクロヘキサンはシクロヘキサンの水素 1 個がクロールに置換された構造を有し脂環式炭化水素に属する化学物質で、農薬原料、ゴム薬原料等に用いられている[1],[2]。毒性情報としては、ラット LD₅₀ 値が 3 g/kg との報告がある[3]。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、OECD TG423 に従いラットの急性毒性試験を行ったので報告する。

その後の投与段階には第 2 回投与を B041793A, 第 3 回投与を B041793B, 第 4 回投与を B041793C とした.

8. 結果および結論

8.1 一般状態 (Table 1, Appendix 1)

第 1 回～4 回投与群の 300 および 2000 mg/kg とも死亡はなく、一般状態にも変化は認められなかった。

8.2 体重および体重増加量 (Tables 2 and 3, Appendix 2 and 3)

第 1 回および 2 回投与群の 300 mg/kg では、体重は順調に増加した。

第 3 回および 4 回投与群の 2000 mg/kg では、投与第 4 日に体重増加の抑制あるいは減少が認められたが、第 8 日には回復し、第 15 日には 300 mg/kg と同等となつた。

8.3 剖検 (Table 4, Appendix 4)

第 1 回～4 回投与群の 300 および 2000 mg/kg とも異常は認められなかった。

8.4 結論

クロロシクロヘキサンを 300 および 2000 mg/kg の用量で雌ラットに単回経口投与し、その急性毒性変化を検討した。

第 1 回～4 回投与群の 300 および 2000 mg/kg の用量いずれにも、死亡例はなく、一般状態および剖検に異常は認められなかった。2000 mg/kg では体重増加の抑制や減少がみられたが投与第 8 日には回復した。

本試験条件下におけるクロロシクロヘキサンの概略の半数致死量は、2000 mg/kg 以上、GHS は Category 5 (>2000-5000 mg/kg b.w.) に分類された。

Table 1 Clinical Sign - Summary

Test Substance Dose	Findings	Day Time	Female														
			10	20	30	40	50	60	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CCH 300 mg/kg (First)	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No Abnormality		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CCH 300 mg/kg (Second)	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No Abnormality		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CCH 2000 mg/kg (Third)	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No Abnormality		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CCH 2000 mg/kg (Fourth)	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No Abnormality		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

Time 10, Before dosing; Time 20, 10 min. after dosing; Time 30, 30 min. after dosing; Time 40, 1 hr. after dosing; Time 50, 3 hr. after dosing;
Time 60, 6 hr. after dosing;

Table 2 Body Weight - Summary

Test Substance Dose	Day					Female	Unit : g
		1	4	8	15		
CCH 300 mg/kg (First)	Mean	188.0	212.3	221.0	248.0		
	S. D.	5.6	8.4	7.8	17.4		
	n	3	3	3	3		
CCH 300 mg/kg (Second)	Mean	194.0	220.7	229.0	241.3		
	S. D.	5.3	3.5	1.7	7.6		
	n	3	3	3	3		
CCH 2000 mg/kg (Third)	Mean	182.7	182.7	211.0	235.0		
	S. D.	4.5	4.2	6.0	10.5		
	n	3	3	3	3		
CCH 2000 mg/kg (Fourth)	Mean	196.0	184.7	221.3	255.0		
	S. D.	4.4	5.7	12.3	19.1		
	n	3	3	3	3		

Table 3 Body Weight Gain - Summary

Female

Unit : g

Test Substance Dose	Day	1-4	4-8	8-15	
CCH 300 mg/kg (First)	Mean	24.3	8.7	27.0	
	S. D.	4.0	1.2	9.6	
	n	3	3	3	
CCH 300 mg/kg (Second)	Mean	26.7	8.3	12.3	
	S. D.	2.1	2.1	6.7	
	n	3	3	3	
CCH 2000 mg/kg (Third)	Mean	0.0	28.3	24.0	
	S. D.	1.0	9.5	8.7	
	n	3	3	3	
CCH 2000 mg/kg (Fourth)	Mean	-11.3	36.7	33.7	
	S. D.	2.3	8.1	12.6	
	n	3	3	3	

Table 4 Necropsy Findings - Summary

Scheduled Sacrifice (Day 15)

Organ Findings	Sex	:	Female			
	Test Substance	:	CCH (First)	CCH (Second)	CCH (Third)	CCH (Fourth)
	Dose (mg/kg)	:	300	300	2000	2000
	Number of Animals	:	3	3	3	3
	Number of Animals Examined	:	<3>	<3>	<3>	<3>
	No abnormality		3	3	3	3

ほ乳類を用いた既存化学物質毒性試験結果報告書

1. 一般的事項

既存化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	クロロシクロヘキサン				
別 名	シクロヘキシリクロリド			分 予 量	118.61
構造式又は示性式 (又はその製法の概要)				常温における性状	無色～わずかにうすい黄色
Lot No. 5C1114 試験に供した化学物質の純度 不純物の名称および濃度 CAS番号	(C ₆ H ₁₁ Cl) 99.7% — 542-18-7	物理化学性状	安 定 性	—	
			融 点	−44°C	
			沸 点	142°C	
			蒸 気 壓	6.73 mmHg (25°C)	
			分 配 係 数	—	
			対水溶解度	500 mg/L (25°C)	
			溶 水	50 mg/mLで不溶 ^{*1}	
			DMSO	500 mg/mLで溶解 ^{*1}	
			アセトン	—	
			生食	50 mg/mLで不溶 ^{*1}	
			度 その他	—	

1) DMSO: デメルスルホキド、生食: 生理食塩液、 *1 : 試験施設で実施した溶媒検討の結果による。

2. 急性毒性試験および投与量設定試験

試験 No.	試験の種類 及び期間	動物種	1群当たり の動物数	投与 経路	投与量 (mg/kg/day)	LD ₅₀ 値又はNOEL* (mg/kg)	実験場所
1	急性毒性試験	ラット	雌 3匹 ^{a)}	経口	300 300 2000 2000	第1回投与: 3匹中死亡なし 第2回投与: 3匹中死亡なし 第3回投与: 3匹中死亡なし 第4回投与: 3匹中死亡なし Category 5 (>2000-5000 mg/kg b.w.) に分類された。	(株)三菱化 学安全科学 研究所 鹿島研究 所
2	投与量設定試験 (14日間反復)	ラット	雄 3匹/群 雌 3匹/群	経口	1000 300 100 30 0	第8日までに雌雄全例が死亡 りした。 雄では被験物質に起因する 明確な変化は認められなか った。 雌では流涎、副腎重量 の高値が認められた。 被験物質に起因する変化は 認められなかった。 NOEL 被験物質に起因する変化は 認められなかった。 変化なし。	(株)三菱化 学安全科学 研究所 鹿島研究 所

*NOEL : No-Observed-Effect Level

a) 第1回～4回のいずれも雌3匹に投与した。

b) 激死期解剖動物を含む。

3. 経口投与反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

被験物質	クロロシクロヘキサン CAS No.: 542-18-7				
被験物質投与期間	雄: 平成17年7月12日～平成17年8月22日 [計42日間] 雌: 平成17年7月12日～平成17年9月4日				
使用動物種・系統 投与経路	ラット, Crl:CD(SD) 強制経口投与	1群の動物数; 雄雄各12匹 (雌は対照群および 300 mg/kg群に回復動物として各5匹を追加)			被験物質純度 99.7%

1) 反復投与毒性

検査項目 [性] [動物数] ^a	用量 (mg/kg/day)	対照群	10	60	300	対照群	300
		投与終了後				回復終了後	
		♂/♀ [7/12]	♂/♀ [12/12]	♂/♀ [12/12]	♂/♀ [7/12]	♂/♀ [5/5]	♂/♀ [5/5]
(↑↓: 傾向, △▽: P<0.05, ▲▼: P<0.01, -: 変化なし, *: 検査せず)							
一般状態							
流涎	+	0/0	0/0	0/0	12/6	0/0	0/0
下腹部の汚れ ^b		0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0
分娩未了 ^b		0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0
全出産児死亡 ^b		0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0
行動検査							
詳細な症状観察		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
機能検査		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
自発運動量		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
体重		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
体重(体重増加量) ^c		-/-	-/▽	-/▼	▽/▽	-/-	-/-
摂餌量		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
血液学検査							
網赤血球数 ^d		-/-	-/-	-/-	△/-	-/-	▽/-
血液生化学検査							
無機リン		-/-	-/-	-/-	-/▽	-/-	-/-
γGT ^e		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/▽
雄の尿検査		-/*	-/*	-/*	-/*	*/*	*/*
器官重量							
腎臓: 絶対重量		-/-	-/-	-/-	↑/-	-/-	↑/-
相対重量		-/-	-/-	-/-	▲/-	-/-	△/-
肝臓: 相対重量		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	▲/△
脾臓: 相対重量		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/△
心臓: 絶対重量		-/-	-/-	-/-	-/▽	-/-	-/-

- c) 対照群および300 mg/kg 群の雄は投与後解剖動物を7匹、残り5匹は回復動物に供した。
- d) 被験物質と関連のない変化と判断した。
- e) 10, 60 mg/kg 群で哺育4日の体重増加量に抑制がみられたが、300mg/kg 群では変化がないことから分娩に伴う一時的な低値と考えられる。
- f) 回復終了後の検査では、低値を示し回復したものと考えられる。
- g) 投与終了後の検査で変化がなかったことから、偶発的な変化と判断した。

3. 経口投与反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

被験物質	クロロシクロヘキサン CAS No. : 542-18-7					
被験物質投与期間	雄：平成 17年7月12日～平成17年8月22日 [計42日間] 雌：平成 17年7月12日～平成17年9月4日					
使用動物種・系統 投与経路	ラット, Crl:CD(SD) 強制経口投与	1群の動物数；雌雄各12匹 (雌は対照群および 300 mg/kg群に回復動物として各5匹を追加)			被験物質純度 99.7%	

1) 反復投与毒性

用量 (mg/kg/day) 検査項目 [性] [動物数] ^{c)}	対照群	10	60	300	対照群	300	
		投与終了後					
		♂/♀ [7/12]	♂/♀ [12/12]	♂/♀ [12/12]	♂/♀ [7/12]		
(↑↓ : 傾向, △▽ : P<0.05, ▲▼ : P<0.01, - : 変化なし, *: 検査せず)							
一般状態							
流涎	+ 0/0	0/0	0/0	12/6	0/0	0/0	
下腹部の汚れ ^{d)}	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	
分娩未了 ^{d)}	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	
全出産児死亡 ^{d)}	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	
行動検査							
詳細な症状観察	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	
機能検査	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	
自発運動量	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	
体重							
体重 (体重増加量) ^{e)}	-/-	-/▽	-/▼	▽/▽	-/-	-/-	
摂餌量	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	
血液学検査							
網赤血球数 ^{f)}	-/-	-/-	-/-	△/-	-/-	▽/-	
血液生化学検査							
無機リン	-/-	-/-	-/-	-/▽	-/-	-/-	
γ GT ^{g)}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/▽	
雄の尿検査	-/*	-/*	-/*	-/*	*/*	*/*	
器官重量							
腎臓：絶対重量	-/-	-/-	-/-	↑/-	-/-	↑/-	
相対重量	-/-	-/-	-/-	▲/-	-/-	△/-	
肝臓：相対重量	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	▲/△	
脾臓：相対重量	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/△	
心臓：絶対重量	-/-	-/-	-/-	-/▽	-/-	-/-	

c) 対照群および300 mg/kg 群の雄は投与後解剖動物を 7 匹、残り 5 匹は回復動物に供した。

d) 被験物質と関連のない変化と判断した。

e) 10, 60 mg/kg 群で哺育 4 日の体重増加量に抑制がみられたが、300mg/kg 群では変化がないことから分娩に伴う一時的な低値と考えられる。

f) 回復終了後の検査では、低値を示し回復したものと考えられる。

g) 投与終了後の検査で変化がなかったことから、偶発的な変化と判断した。

続き

検査項目 用量 (mg/kg/day)		対照群	10	60	300	対照群	300	60	
		投与終了後				回復終了後		全児死亡	
		♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♀	
剖検所見	計画解剖動物[数]	[7/12]	[12/12]	[12/11]	[7/12]	[5/5]	[5/5]	[1]	
	胸腺：								
	小型化	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	1	
	脾臓：								
	小型化	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1	
	肝臓：								
	分葉異常	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0	
	白色結節	2/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0	
	精巢：								
	小型化	0/-	0/-	1/-	0/-	0/-	1/-	-	
	軟化	0/-	0/-	1/-	0/-	0/-	0/-	-	
	精巢上体：								
	小型化	0/-	0/-	1/-	0/-	0/-	0/-	-	
	黄色化	0/-	0/-	1/-	0/-	0/-	0/-	-	
	卵巢：								
	卵巣囊拡張	-/0	-/1	-/0	-/0	-/0	-/0	0	
	子宮：								
	遺残胎児	-/0	-/1	-/0	-/0	-/0	-/0	0	
病理組織所見	検査動物[数]								
	心臓：								
	炎症性細胞浸潤	+	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	3/2	*	*	*	*	2/2	*	*	
	胸腺：								
	萎縮	+	[5/5]	[0/0]	[0/1]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	0/3	*	*	*	0	0/3	*	*	
	0/0	*	*	*	1	0/0	*	*	
	+++	0/0	*	*	0	0/0	*	*	
	脾臓：								
	骨髄外造血	+	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	0/3	*	*	*	*	0/4	*	*	
	気管：								
	気管腺の拡張	+	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	0/0	*	*	*	*	0/1	*	*	
	肺：								
	肺胞内における泡沫								
	細胞の集簇	+	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	1/2	*	*	*	*	2/2	*	*	
	出血	+	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	0/1	*	*	*	*	0/0	*	*	
	骨化生	+	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	0/1	*	*	*	*	0/0	*	*	
	動脈壁における鉱質沈着								
	沈着	+	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	0/0	*	*	*	*	0/1	*	*	
	胃：								
	異所性の胰臓組織	+	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	0/1	*	*	*	*	0/0	*	*	
	肝臓：								
	限局性炎症性細胞浸潤	+	[5/6]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	2/2	*	*	*	*	2/1	*	*	
	限局性、肝細胞、脂肪化	+	[5/6]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	2/0	*	*	*	*	0/0	*	*	
	小葉辺縁性、肝細胞、空胞化	+	[5/6]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	
	2/0	*	*	*	*	1/0	*	*	

続き

用量 (mg/kg/day)	検査項目	投与終了後				回復終了後		全児死亡
		♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	
		(↑↓ : 傾向, △▽ : P<0.05, ▲▼ : P<0.01, - : 変化なし, *検査せず)						
病理組織所見	腎臓 :	[5/5]	[5/0]	[5/0]	[5/5]	[5/0]	[5/0]	[0]
	近位尿細管, 好塩基性尿細管 +	4/3	1/*	2/*	1/1	2/*	2/*	*
	硝子円柱, 尿細管 +	1/0	0/*	1/*	0/0	0/*	0/*	*
	間質におけるリンパ球浸潤 +	1/1	2/*	0/*	2/0	0/*	0/*	*
	近位尿細管における硝子滴沈着 +	0/0	1/*	1/*	0/0	1/*	1/*	*
	+ +	0/0	0/*	0/*	▲5/0	0/*	0/*	*
	腎孟, 炎症性細胞浸潤 +	0/0	0/*	0/*	0/0	1/*	0/*	*
	膀胱 :	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[0]
	粘膜固有層におけるリンパ球浸潤 +	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	*
	粘膜上皮の(単純)過形成 +	0/0	0/0	2/0	△4/4△	0/0	0/3	*
	精巢 :	[5/-]	[0/-]	[1/-]	[5/-]	[0/-]	[1/-]	[-]
	精細管の萎縮 +	1/	* /	0/	0/	* /	* /	
	+ +	0/	* /	1/	0/	* /	1/	
	精巢上体 :	[5/-]	[0/-]	[2/-]	[5/-]	[0/-]	[0/-]	[-]
	精巢上体管における細胞残屑 +	0/	* /	1/	0/	* /	* /	
	限局性細胞浸潤 +	0/	* /	0/	1/	* /	* /	
	精巢上体管における精子減少 + +	0/	* /	1/	0/	* /	* /	
	精子肉芽腫 +	0/	* /	1/	0/	* /	* /	
	精囊 :	[5/-]	[0/-]	[0/-]	[5/-]	[0/-]	[0/-]	[-]
	間質におけるリンパ球湿潤 +	2/	* /	* /	3/	* /	* /	
	卵巣 [-/0]	[-/1] ^{b)}	[-/0]	[-/0]	[-/0]	[-/0]	[-/0]	[0]
	卵巣囊, 炎症性細胞浸潤 +	/*	/1	/*	/*	/*	/*	*
	卵巣囊の拡張 +	/*	/1	/*	/*	/*	/*	*
	黄体細胞の壊死(片側) + + +	/*	/1	/*	/*	/*	/*	*
	下垂体 :	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[0]
	異所性頭蓋咽頭管組織 +	0/0	*/*	*/*	0/1	*/*	*/*	*
	甲状腺 :	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[0]
	異所性胸腺組織 +	1/2	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	*
	鰓後体遺残 +	2/1	*/*	*/*	2/2	*/*	*/*	*
	副腎 :	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[0]
	副副腎 +	1/0	*/*	*/*	0/1	*/*	*/*	*
	限局性, 束状帶, 脂肪化 +	1/0	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	*
	その他, 異常所見の認められなかった器官・組織							
	脳, リンパ節(下頸・腸間膜), 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 上皮小体, 精囊腺(凝固腺含む), 子宮, 膀胱, 骨髄(大腿骨), 坐骨神経, 脊髄							

h) 分娩未了の動物。

2) 生殖発生毒性

検査項目 用量(mg/kg/day)	対照群	10	60	300
	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀
(↑ ↓ : 傾向, △▽ : P<0.05, ▲▼ : P<0.01, - : 変化なし, *:検査せず)				
検査母動物[数]	[12]	[12]	[12]	[12]
Pregnancy Data				
平均性周期日数	4.13	4.08	4.25	4.00
異常性周期の発現数	0/12	0/12	0/12	0/12
交配対[12]	[12]	[12]	[12]	[12]
交尾率 Copulation Index (%) [数]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]
受胎率 Fertility Index (%) [数]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]
検査母動物[数]	[12]	[12]	[12]	[12]
黄体数	16.7	15.9	15.5	15.8
着床数	15.4	13.9	14.4	15.2
着床率 Implantation Index (%)	92.88	86.63	92.75	95.88
受胎雌数	12	12	12	12
生児出産雌数	12	11	12	12
出産率 Gestation Index (%)	100.0	91.7	100.0	100.0
分娩動物[数]	[12]	[11]	[12]	[12]
妊娠期間 Gestation Length (days)	22.8	22.6	22.7	22.6
哺育異常	0	0	0	0
Litter Data				
出産児数 ⁱ⁾ (総出産児数)	14.1 (169)	14.0 (154)	14.0 (168)	14.3 (171)
分娩率 Delivery Index (%)	91.40	88.97	96.82	94.23
生存児数 (哺育 0 日)	13.8	14.0	13.5	14.2
出生率 Live Birth Index (%)	98.20	100.00	97.06	99.48
性比 (♂/♀) 分娩日	0.92	1.33	0.81	1.28
生存児数 (哺育 4 日)	13.6	13.8	12.5	14.1
新生児の 4 日生存率				
Viability Index (%)	98.33	98.75	91.11	99.44
体重 哺育 0 日(g)	7.3/7.0	7.1/6.6	7.1/6.7	6.6/6.2
哺育 4 日(g)	11.9/11.4	11.7/11.0	11.8/11.3	10.4/10.0
体重増加量 哺育 0-4 日(g)	4.6/4.4	4.6/4.3	4.6/4.4	3.9/3.8
新生児				
外表面異常の発現率 (%)				
無尾 (例数)	0.0	0.0	0.6(1)	0.0
鎖肛 (例数)	0.0	0.0	0.6(1)	0.0
剖検所見	-	-	-	-

i) 1 腹当たりの平均出産児数

NOEL (mg/kg/day)	[反復投与毒性] 雄: 10 mg/kg/day 雌: 60 mg/kg/day
	[生殖発生毒性] 親動物: 雄雄 300 mg/kg/day 児動物: 300 mg/kg/day
NOEL の推定根拠	[反復投与毒性] 300 mg/kg 群で投与後の流涎および体重増加の抑制が雌雄、腎臓の近位尿細管上皮における硝子滴沈着の增强が 300 mg/kg 群の雄、膀胱粘膜の単純過形成が 60 mg/kg 以上の群の雄および 300 mg/kg 群の雌で認められた。この他、300 mg/kg 群では網赤血球数の高値が雄、無機リンの低値が雌、腎臓重量の高値が雄で認められた。 [生殖発生毒性] 生殖発生毒性への影響は親動物および新生児に対しても被験物質に起因する変化は認められなかった。

4. その他

試験実施施設	名 称	株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
	所在地	茨城県神栖市砂山 14 番地 電話 0479-46-2871 (代表) FAX 0479-46-2874 (代表)
試験責任者	職氏名	安全性第 2 研究部 副主任研究員 [REDACTED]
	経験年数	10 年間
試験番号		B-041794
試験実施年月日		2005 年 6 月 20 日 ~ 2007 年 1 月 23 日

3. 試験実施概要

3.1 表題

クロロシクロヘキサンのラットを用いた経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

3.2 試験番号

B041794

3.3 試験目的

クロロシクロヘキサンを経口投与した時の反復投与毒性および生殖発生毒性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

OECD ガイドライン No.422, March 22, 1996

3.5 適用 GLP

OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」

(厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準, 薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号, 平成 15 年 11 月 21 日)

3.6 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県神栖市砂山 14 番地

3.9 試験責任者

株式会社三菱化学安全科学研究所

5. 要約

クロロシクロヘキサンを 10, 60 および 300 mg/kg/day の用量で SD 系ラット [Crl:CD(SD)] の雌雄に交配前 14 日から交配を経て雄は計 42 日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育 4 日まで投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性、ならびにそれらの変化の回復性について検討した。1 群の動物数は雄で各 12 匹（回復動物含む）、雌で各 12 匹（回復動物として対照群および 300 mg/kg 群に各 5 匹を追加）とし、対照群には媒体（局方オリブ油）のみを投与した。

反復投与毒性

投与後の流涎および体重増加の抑制が 300 mg/kg 群の雌雄で認められた。病理組織学検査では、腎臓の近位尿細管上皮における硝子滴沈着の増強が 300 mg/kg 群の雄、膀胱粘膜の単純過形成が 60 mg/kg 以上の群の雄および 300 mg/kg 群の雌で認められた。この他、300 mg/kg 群では網赤血球数の高値が雄、無機リンの低値が雌、腎臓重量の高値が雄で認められた。これらの変化は 2 週間の回復期間により回復傾向を示したが、雄の腎臓重量、雌の膀胱粘膜の単純過形成では明確な回復は認められなかった。

その他、詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定でも被験物質の影響はなく、神経症状を示唆する変化は認められなかった。また、生殖器系に対し被験物質に起因する変化は認められなかった。

生殖発生毒性

親動物に対し性周期、交尾率、受胎率、分娩率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩および哺育行動、新生児に対しては出産児数、出生率、性比、新生児の 4 日生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、クロロシクロヘキサンの本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雄で 10 mg/kg/day、雌で 60 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄の親動物および児動物とも 300 mg/kg/day と考えられる。

8. 結果

8.1 反復投与毒性

8.1.1 一般状態

結果を Tables 1-6, Appendices 1-6 に示す。

投与後の症状として、流涎が 300 mg/kg 群の第 9 日から剖検までの間に、雄で全例、雌で 6 例に認められた。分娩未了が 10 mg/kg 群の 1 例（動物番号：50205）、全出産児死亡が 60 mg/kg 群の 1 例（動物番号：50304）に認められた。分娩未了の動物は分娩開始から 2 日間（妊娠 23 日～25 日、難産）を要しても分娩が完了しなかったため交尾確認後 26 日に、全出産児が死亡した母動物は哺育 0 日より下腹部の汚れを示し、哺育 2 日に出産児が全例死亡したためそれ剖検した。回復期間中は雌雄ともに異常は認められなかった。

8.1.2 行動検査

8.1.2.1 詳細な症状観察

結果を Table 7, Appendices 7, 8 に示す。

投与期間中、雌雄とも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

8.1.2.2 機能検査

結果を Table 8, Appendices 9, 10 に示す。

刺激に対する反応性および握力測定の結果、雌雄とも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

8.1.2.3 自発運動量の測定

結果を Figs. 1, 2, Tables 9, 10, Appendices 11, 12 に示す。

雌雄とも各測定点および合計の運動量は、各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.3 体重

結果を Figs. 3-5, Tables 11-20, Appendices 13-22 に示す。

300 mg/kg 群の雄で体重増加の抑制が第 8 日から 42 日まで認められた。同群の雌では体重増加量が対照群と比べ第 15 日に低値を示しただけであったが、妊娠期間中では体重増加の抑制傾向を示した。

その他、10 および 60 mg/kg 群の雌で哺育 4 日の体重増加量が対照群と比べ低値を示した。しかし、300 mg/kg 群では変化がないことから分娩に伴う一時的な低値と考えられる。

回復期間中は雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.4 摂餌量

結果を Figs. 6-8, Tables 21-25, Appendices 23-27 に示す。

雌雄の投与期間および回復期間のいずれにも、各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.5 血液学検査

結果を Tables 26, 27, Appendices 28, 29 に示す。

投与終了後の検査では、網赤血球数の高値が 300 mg/kg 群の雄に認められた。回復終了後の検査では、同群の前述の項目が低値を示し、回復したものと考えられる。10, 60 mg/kg 群の雄および雌では、対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.6 血液生化学検査

結果を Tables 28, 29, Appendices 30, 31 に示す。

投与終了後の検査で無機リンの低値が 300 mg/kg 群の雌で認められた。

回復終了後の検査で γ GT の低値が 300 mg/kg 群の雌で認められたが、投与終了後検査では変化がなかったことから、偶発的な変化と考えられる。

雄および 10, 60 mg/kg 群の雌では、対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.7 雄の尿検査

結果を Table 30, Appendix 32 に示す。

各被験物質投与群とも変化は認められなかった。

8.1.8 器官重量

結果を Tables 31-36, Appendices 33-38 に示す。

投与期間終了後の検査で、腎臓の絶対重量の高値傾向、相対重量の高値が 300 mg/kg 群の雄で認められた。

回復期間終了の検査では、腎臓の絶対重量の高値傾向、相対重量の高値、肝臓の相対重量の高値が 300 mg/kg 群の雄、肝臓および脾臓の相対重量の高値が同群の雌で認められた。

なお、心臓の絶対重量の低値が 300 mg/kg 群の雌でみられたが、解剖時の体重が低値傾向を示していること、相対重量に変化がないことから偶発的な変化と考えられる。その他、10, 60 mg/kg 群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.9 剖検所見

結果を Table 37, Appendices 39, 40 に示す。

生殖器系への変化として、投与後解剖動物では両側性の精巣の小型および軟化な

らびに両側性の精巣上体の小型が 60 mg/kg 群の 1 例（動物番号：00303），両側性の精巣上体の黄色化が同群の 1 例（動物番号：00311），回復後解剖動物では両側性の精巣の小型が 300 mg/kg 群の 1 例（動物番号：00408）に認められた。上記の投与後解剖動物はいずれも雌との交尾が認められ，その相手雌は受胎していることから生殖機能に影響を及ぼすものではないと考えられる。なお，本所見は対照群でもしばしば観察されることから，被験物質に起因する変化ではないと判断した。

分娩未了の 10 mg/kg 群の 1 例（動物番号：50205，非分娩動物）では，左子宮角における胎児遺残および同側卵巣における卵巣嚢の拡張が認められた。また，妊娠 26 日に剖検したことから，遺残した胎児は正常より大型であった。全出産児が死亡した 60 mg/kg 群の 1 例（動物番号：50304）では，胸腺および脾臓の小型化が認められた。

その他，投与後および回復後解剖動物でいくつかの肉眼的変化が認められたが，用量群に関係なく散発的な発現であることから被験物質とは関連のない変化と判断した。

8.1.10 病理組織所見

結果を Table 38, Appendices 39, 40 に示す。

被験物質に起因すると思われる変化が雄の腎臓および雌雄の膀胱に認められた。その発現状況を文中表 1 にまとめた。

文中表 1 被験物質に起因すると思われる病理組織変化とその発現状況

器官名 所見	性別	雄				雌					
		投与後解剖		回復後解剖		投与後解剖		回復後解剖			
		0	10	60	300	0	300	0	10	60	300
グレード											
腎臓											
硝子滴の沈着	+	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
	++	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
膀胱											
粘膜上皮の単純過形成	+	0	0	2	4	0	0	0	0	4	0
	グレード : +, 軽微 ; ++, 軽度										3

腎臓では，近位尿細管上皮における硝子滴沈着の増強が投与後解剖動物の 300 mg/kg 群の雄で認められた。すなわち，300 mg/kg 群では軽度の硝子滴が雄全例，10 および 60 mg/kg 群では軽微な変化が雄各 1 例に認められた。なお，回復後の対照群でも軽微な変化が雄 1 例にみられていることから，10 および 60 mg/kg 群の変化は自然発生性の変化と考えられる。一方，回復終了後の 300 mg/kg 群でも軽微な変化が雄 1 例にみられただけで，休薬により回復を示しているものと考えられる。

膀胱では，軽微な膀胱粘膜の単純過形成が 60 mg/kg 群の雄 2 例，300 mg/kg 群の

雌雄各 4 例に認められた。回復後の解剖動物では軽微な変化が 300 mg/kg 群の雌 3 例に認められ、回復期間を経ることで雄では消失、雌では消失しなかった。なお、粘膜固有層におけるリンパ球浸潤が、300 mg/kg 群の投与後解剖動物および回復後解剖動物のそれぞれ雌雄各 1 例に認められた。この変化は自然発生的にみられる程度であり発現頻度も低いことから、被験物質とは関連のない変化と判断した。また、これらリンパ球浸潤を示した動物では、粘膜の単純過形成が 300 mg/kg 群の回復後解剖動物の雄 1 例を除き認められた。しかし、他の粘膜の単純過形成を示した動物ではリンパ球浸潤がないことから、リンパ球浸潤と過形成との間に明確な関連性はないものと考えられる。

このほか生殖器を含め、種々の組織変化が投与後および回復後解剖動物の対照群を含む各群で認められた。しかし、それらはラットでは非特異的に発現する変化であり、その発現状況に明らかな群差がみられないことから、被験物質と関連のない変化と判断した。

剖検時、胎児遺残と卵巣囊の拡張がみられた非分娩動物では、卵巣囊および周囲脂肪組織に炎症性細胞浸潤が認められ、卵巣の黄体細胞の壊死が顕著であった。なお、対側卵巣には異常は認められなかった。胸腺および脾臓の小型化が認められた全出産児が死亡した母動物では、胸腺は萎縮していたが、脾臓には組織学的異常は認められなかった。

8.2 生殖発生毒性

8.2.1 生殖機能

結果を Table 39, Appendices 41, 42 に示す。

性周期検査では、4 日周期を示した動物が対照群、10, 60 および 300 mg/kg 群でそれぞれ 12 例中、10, 11, 9 および 12 例であり、被験物質による性周期の延長あるいは短縮は認められなかった。また、異常性周期を示す動物は認められなかった。

交尾は各群の全例で成立し、交尾率、受胎率、交尾所要日数、交尾成立までに逸した発情期の回数とともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

8.2.2 分娩および哺育状態

結果を Table 40, Appendix 43 に示す。

妊娠期間、黄体数、着床数、着床率および分娩率のいずれにも被験物質投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

分娩状態の観察では、分娩未了が 10 mg/kg 群の 1 例（動物番号：50205）に認められた。妊娠 23 日の観察では新生児 2 例の娩出がみられたが、翌日には 2 例とも食殺され、母動物の子宮内には胎児が触診により確認された。本動物の観察を続けたが分娩が完了しなかったため、妊娠 26 日に剖検し、子宮内に胎児 3 例の

遺残を確認した。全出産児の死亡が 60 mg/kg 群の 1 例（動物番号：50304）で哺育 2 日にみられたが、当該母動物は分娩後に授乳、胎盤摂取、新生児回集などの哺育行動を示さなかった。その他の母動物に分娩および哺育行動の異常は認められなかった。

8.2.3 新生児への影響

8.2.3.1 新生児の観察

結果を Tables 41, 42, 45, Appendices 44, 45, 48 に示す。

生後 0 日および 4 日の生存児の性比が 10 mg/kg 群、生後 4 日の生存児の性比が 300 mg/kg 群でそれぞれ対照群と比べ有意差が認められた。その他、出産児数、出生率および新生児の 4 日生存率では被験物質投与群と対照群との間に有意差はなく、一般状態においても被験物質に起因する変化は認められなかった。なお、外表異常として無尾および鎖肛の合併が 60 mg/kg 群の雄 1 例で認められたが、1 例にみられただけで、300 mg/kg 群では観察されていないことから、被験物質と関連のない自然発生性の変化と判断した。

8.2.3.2 体重

結果を Tables 43, 44, Appendices 46, 47, 50 に示す。

雌雄の体重および体重増加量とも被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

8.2.3.3 剖検

結果を Table 46, Appendix 49 に示す。

生後 4 日の生存児の剖検および死亡児の剖検では、被験物質に起因する異常所見は認められなかった。

9. 考察および結論

クロロシクロヘキサンを 10, 60 および 300 mg/kg の用量で SD 系ラット [Crl:CD(SD)] の雌雄に交配前 14 日から交配を経て雄は計 42 日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育 4 日まで投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性、ならびにそれらの変化の回復性について検討した。

反復投与毒性

投与後の流涎が 300 mg/kg 群で雄全例、雌 6 例に認められた。製造者の安全データシートによれば接触、経口、吸入の各経路において刺激を有すること[3]、被験物質の類似物質であるシクロヘキサンは皮膚刺激物質であることが知られている[2]ことから、流涎は被験物質が有する刺激作用により誘発された変化と考えられる。その他、投与期間中には被験物質に起因する変化は認められなかった。分娩未了が 10 mg/kg 群、全出産児死亡が 60 mg/kg 群で各 1 例にみられたが、300 mg/kg 群では分娩および哺育行動の異常が認められていないことから、被験物質と関連のない偶発的な変化と考えられる。なお、詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定でも被験物質の影響はなく、神経症状を示唆する変化は認められなかった。

病理学検査の結果、被験物質に起因する変化として腎臓の近位尿細管上皮における硝子滴沈着の増強が 300 mg/kg 群の雄、膀胱粘膜の単純過形成が 60 mg/kg 以上の群の雄および 300 mg/kg 群の雌で認められた。腎臓における硝子滴の沈着は、蛋白物質が尿細管上皮に再吸収されることで発現する変化であり、雄ラットでは種々の化学物質投与によって α 2U グロブリンを含む硝子滴の発現が増強するとされている[5]。本試験でも雄においてのみ発現し、300 mg/kg 群ではその程度が増強された。また、器官重量では腎臓重量の高値が 300 mg/kg 群の雄で認められ、組織学的变化に起因するものと考えられる。

膀胱における膀胱粘膜の単純過形成は、種々の原因による移行上皮の損傷部における再生像であり、毒性学的な刺激を除去すれば正常に回復するとされている[6]。本試験では 2 週間の回復期間により雄では消失したが、雌での回復性は認められなかった。剖検および病理組織学検査では、生殖器系に対し被験物質に起因する変化は認められなかった。

体重增加の抑制が投与期間中の 300 mg/kg 群の雌雄で認められた。網赤血球数の高値が 300 mg/kg 群の雄でみられたが、造血器系の重量変化や組織学検査でも異常がなく、その影響の程度としては軽度なものと考えられる。血液生化学検査では無機リンの低値が 300 mg/kg 群の雌で認められた。しかし、無機リンの低下と関連すると考えられる上皮小体機能亢進や腎尿細管の再吸収障害などを示唆する病理組織学変化がみられなったことから、その要因は不明であった。器官重量

では、回復期間終了後の検査で、肝臓の相対重量の高値が 300 mg/kg 群の雄、肝臓および脾臓の相対重量の高値が同群の雌で認められた。投与期間終了後の検査でも同器官は高値傾向を示し、被験物質の影響が疑われた。しかし、血液検査、血液生化学検査および病理組織学検査などから重量増加を示唆する変化が認められていないことから、毒性学的に重要な変化ではないと考えられる。

被験物質に起因する上述の変化は、回復期間により対照群と同様となるか、あるいは消失し、回復傾向を示しているものと考えられる。しかし、雄の腎臓重量、雌の膀胱粘膜の単純過形成については明確な回復性が認められなかった。

生殖発生毒性

性周期、交尾率、受胎率、分娩率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩および哺育行動のいずれにも被験物質に起因する変化は認められず、親動物に対し生殖機能への影響はないと考えられる。

新生児の検査において、生後 0 日および 4 日の生存児の性比が 10 mg/kg 群、生後 4 日の生存児の性比が 300 mg/kg 群でそれぞれ対照群と比べ有意差が認められた。しかし、生後 0 日の時点の全出産児における性比には有意差がないこと、被験物質投与群で雌雄の偏りについて一定の傾向がないこと、対照群における死亡児の偏りが認められたことから、被験物質と関連のない偶発的な変化と考えられる。他の検査では、出産児数、出生率、生後 4 日の生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。したがって、被験物質は次世代の発生および発育へ影響を及ぼすものではないと考えられる。

以上のように、クロロシクロヘキサンを反復経口投与した結果、一般毒性学的な主な変化として、300 mg/kg 群で投与後の流涎および体重増加の抑制が雌雄、腎臓における硝子滴の沈着と重量増加が雄、さらに 60 mg/kg 以上の群の雄および 300 mg/kg 群の雌で膀胱粘膜の単純過形成が認められた。これらの変化は 2 週間の回復期間により回復傾向を示したが、雄の腎臓重量および雌の膀胱粘膜の単純過形成は 2 週間以上の回復期間が必要と考えられた。生殖発生毒性への影響は親動物および新生児に対しても被験物質に起因する変化は認められなかった。

したがって、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雄で 10 mg/kg/day、雌で 60 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄の親動物および児動物とも 300 mg/kg/day と考えられる。

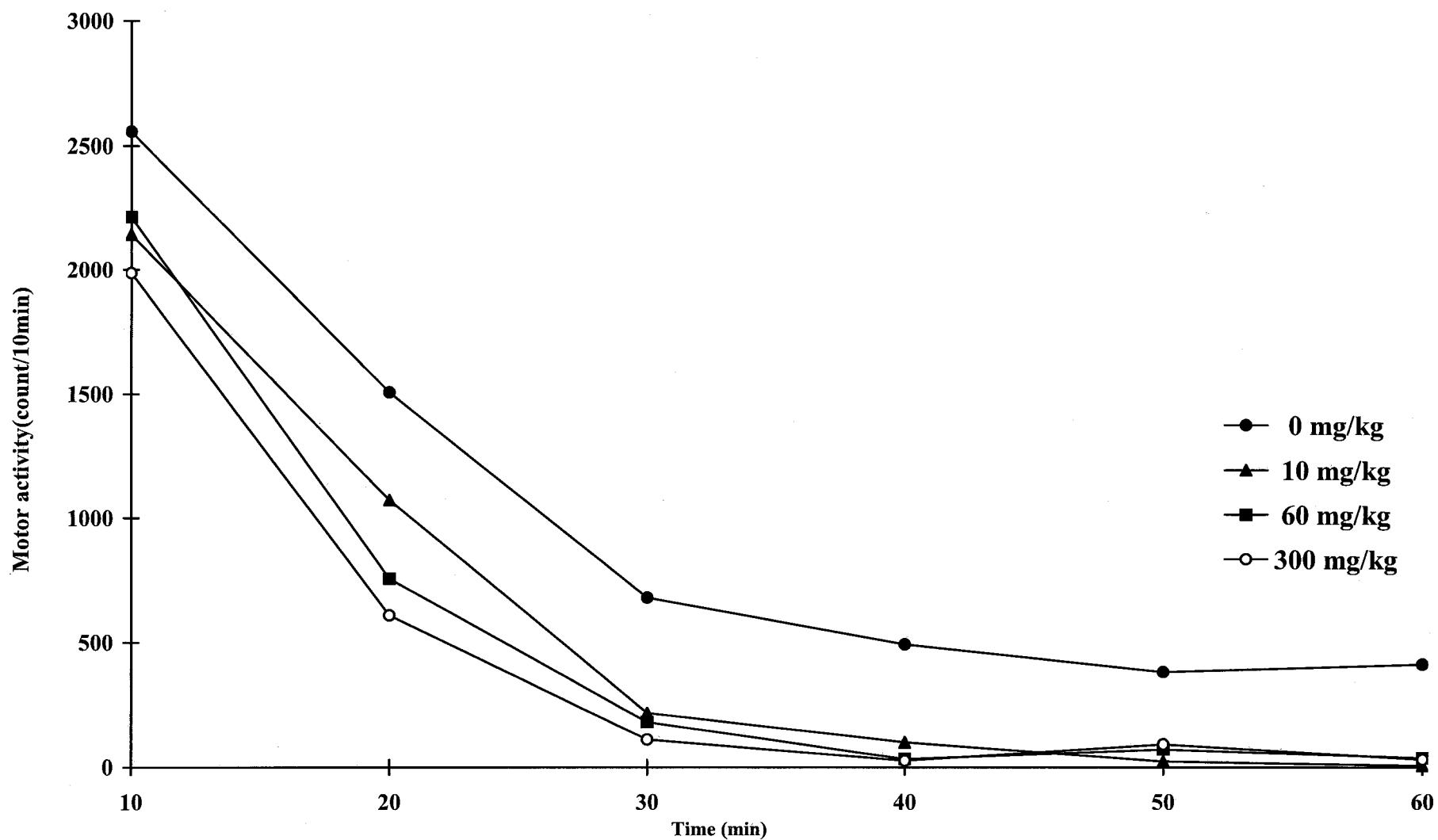


Fig.1 Motor Activity of male rats treated orally with Chlorocyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

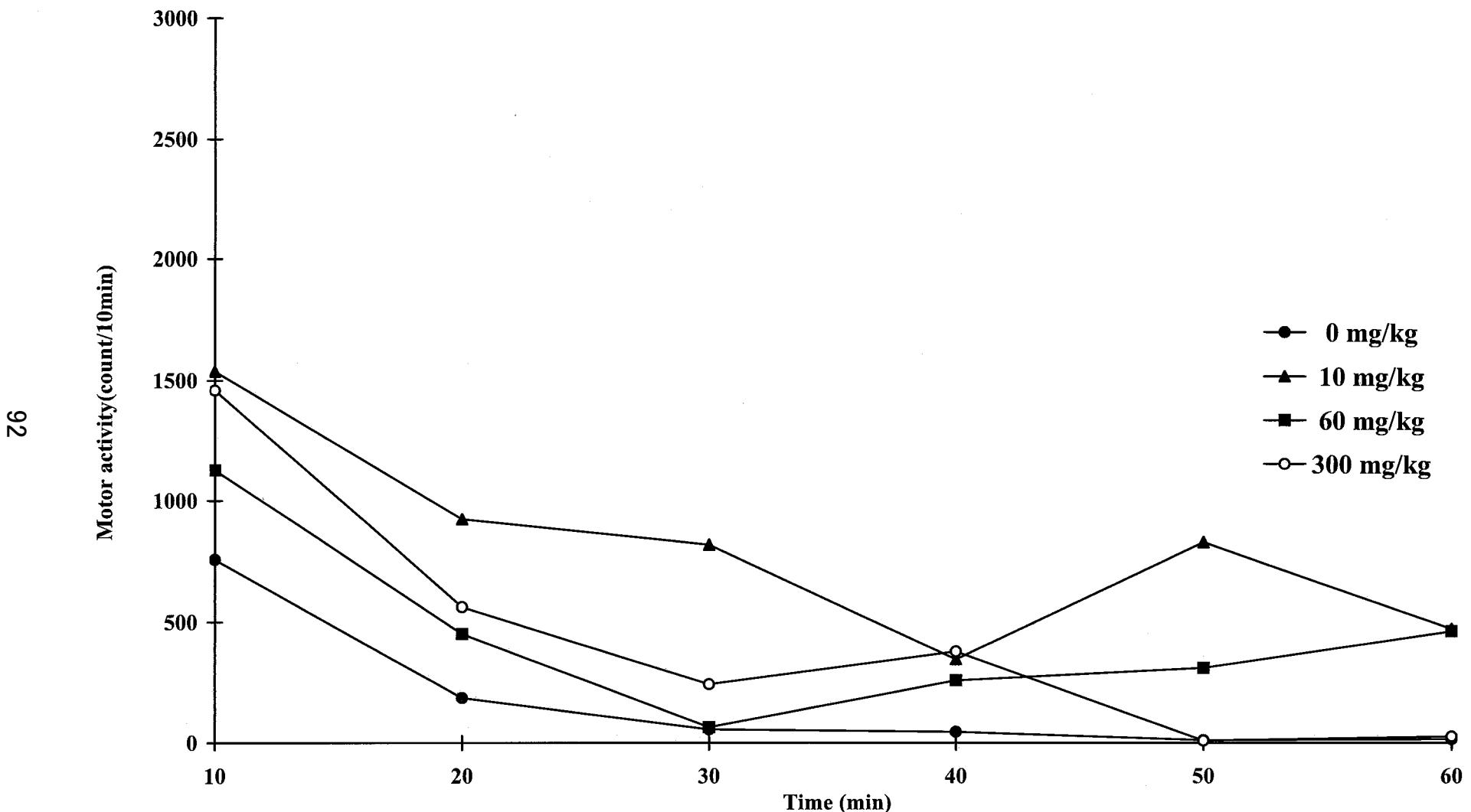


Fig.2 Motor Activity of female rats treated orally with Chlorocyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

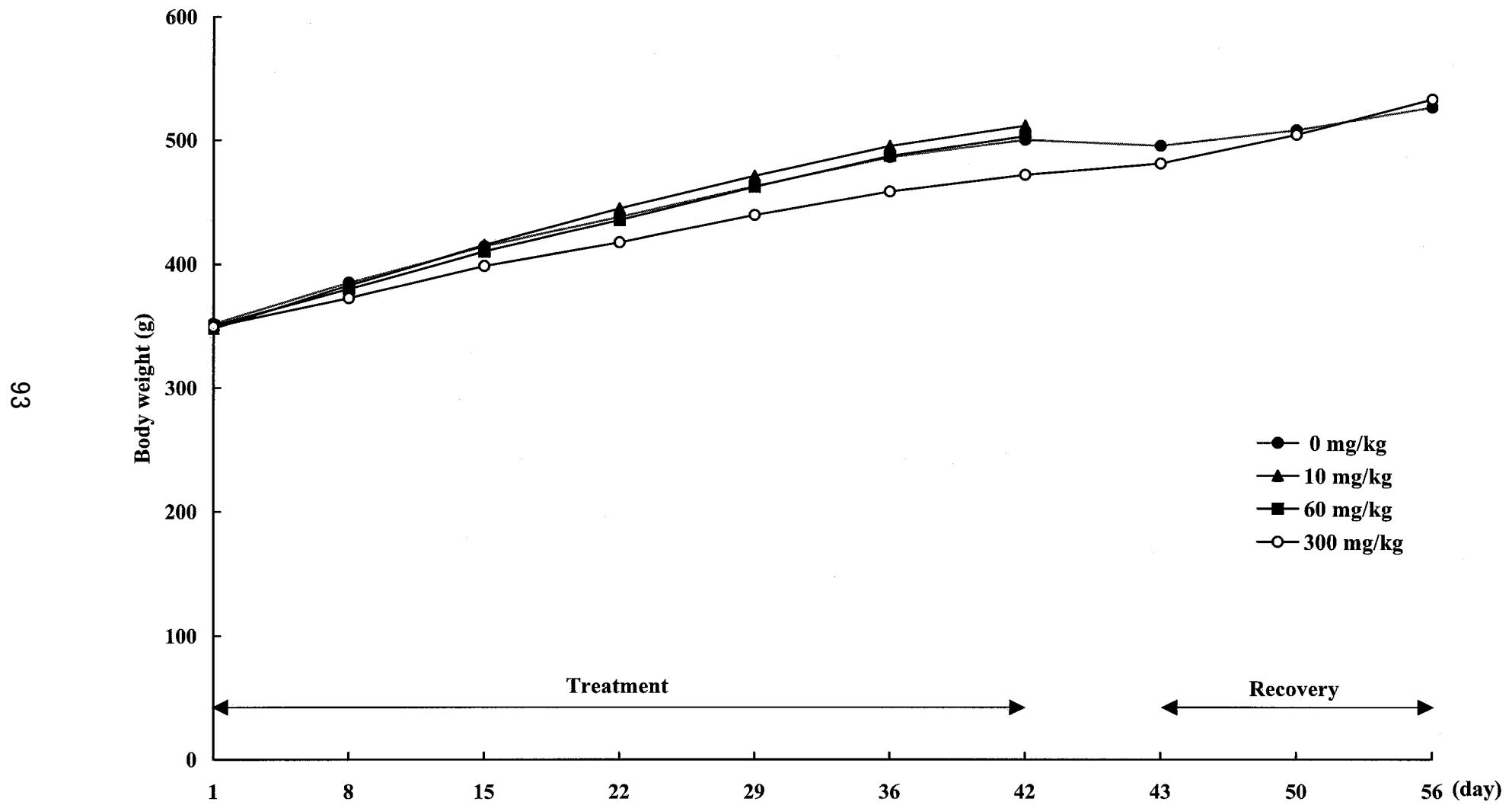


Fig.3 Body weight changes of male rats treated orally with Chlorocyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

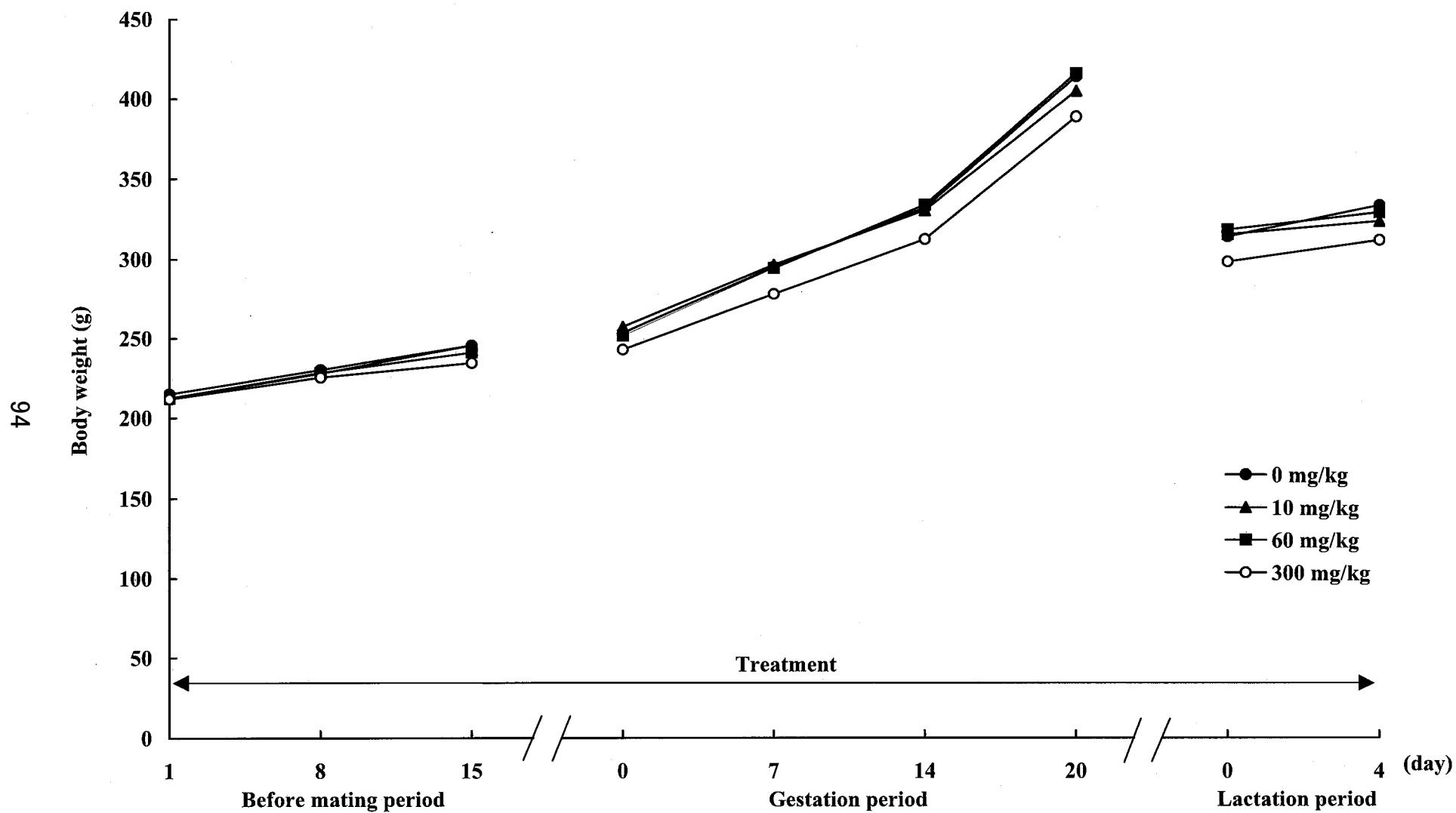


Fig.4 Body weight changes of female rats treated orally with Chlorocyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Study No. B041794

§6

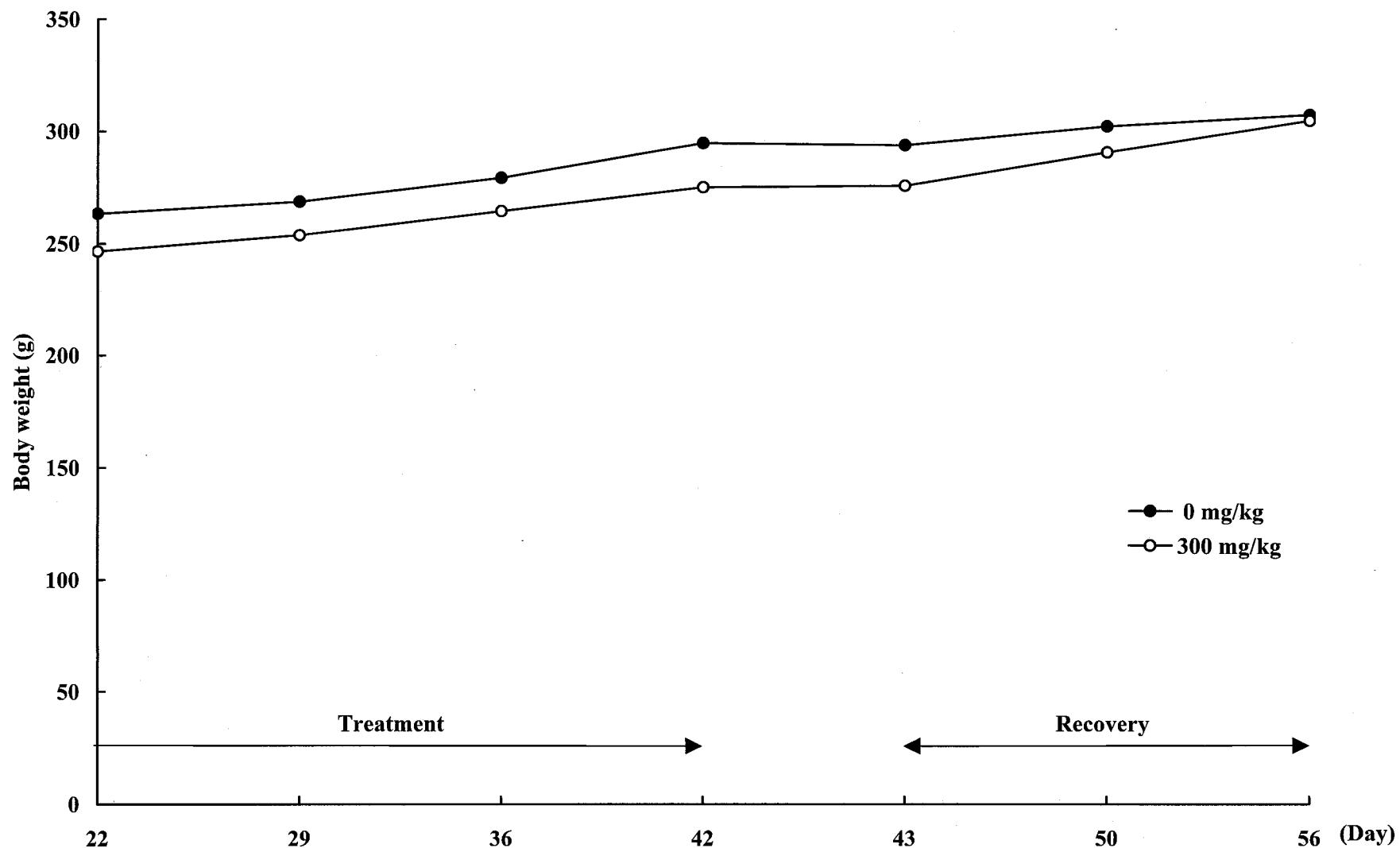


Fig.5 Body weight changes of female rats (satellite animal) treated orally with Chlorocyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

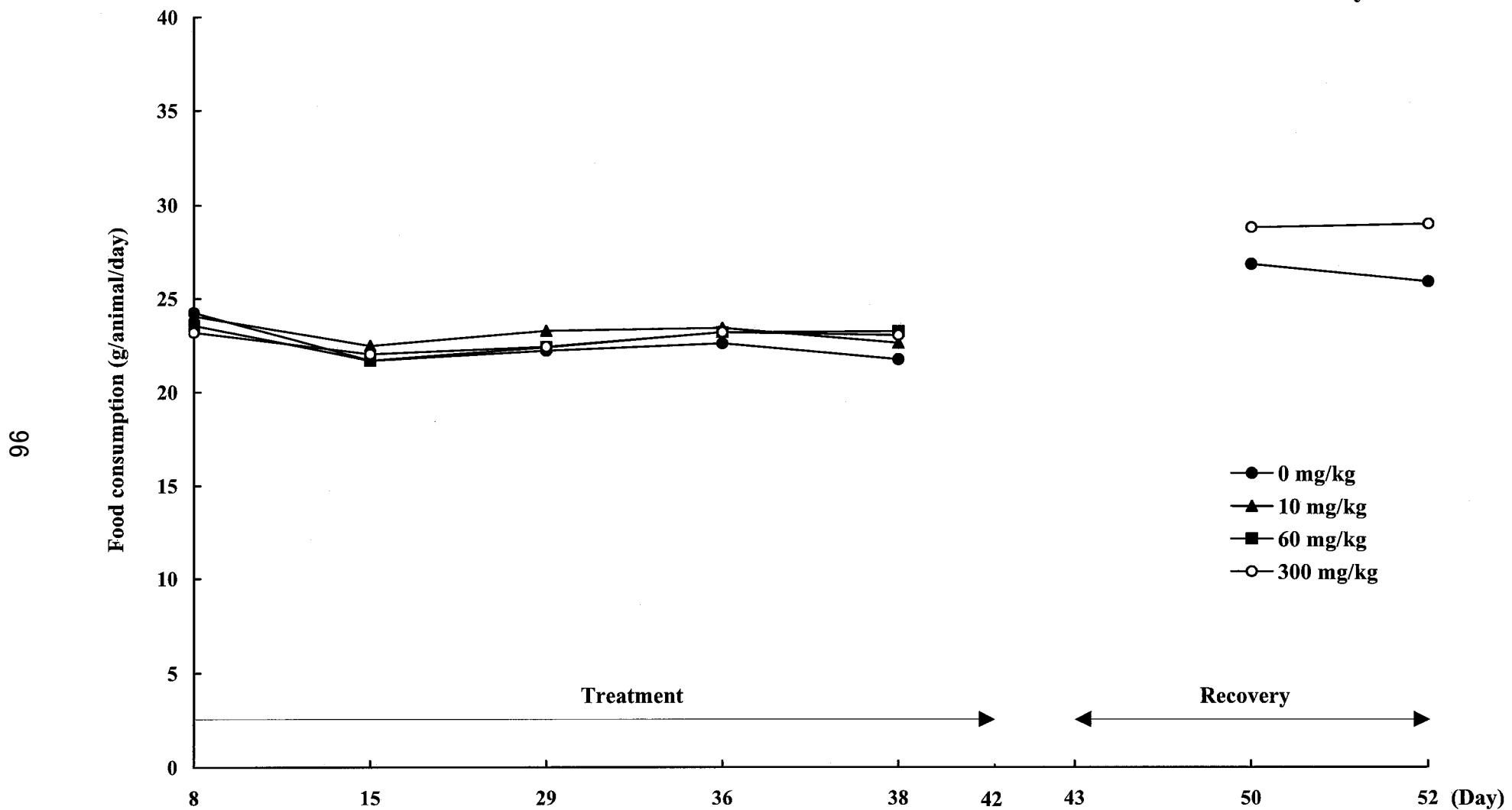


Fig.6 Food consumption of male rats treated orally with Chlorocyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

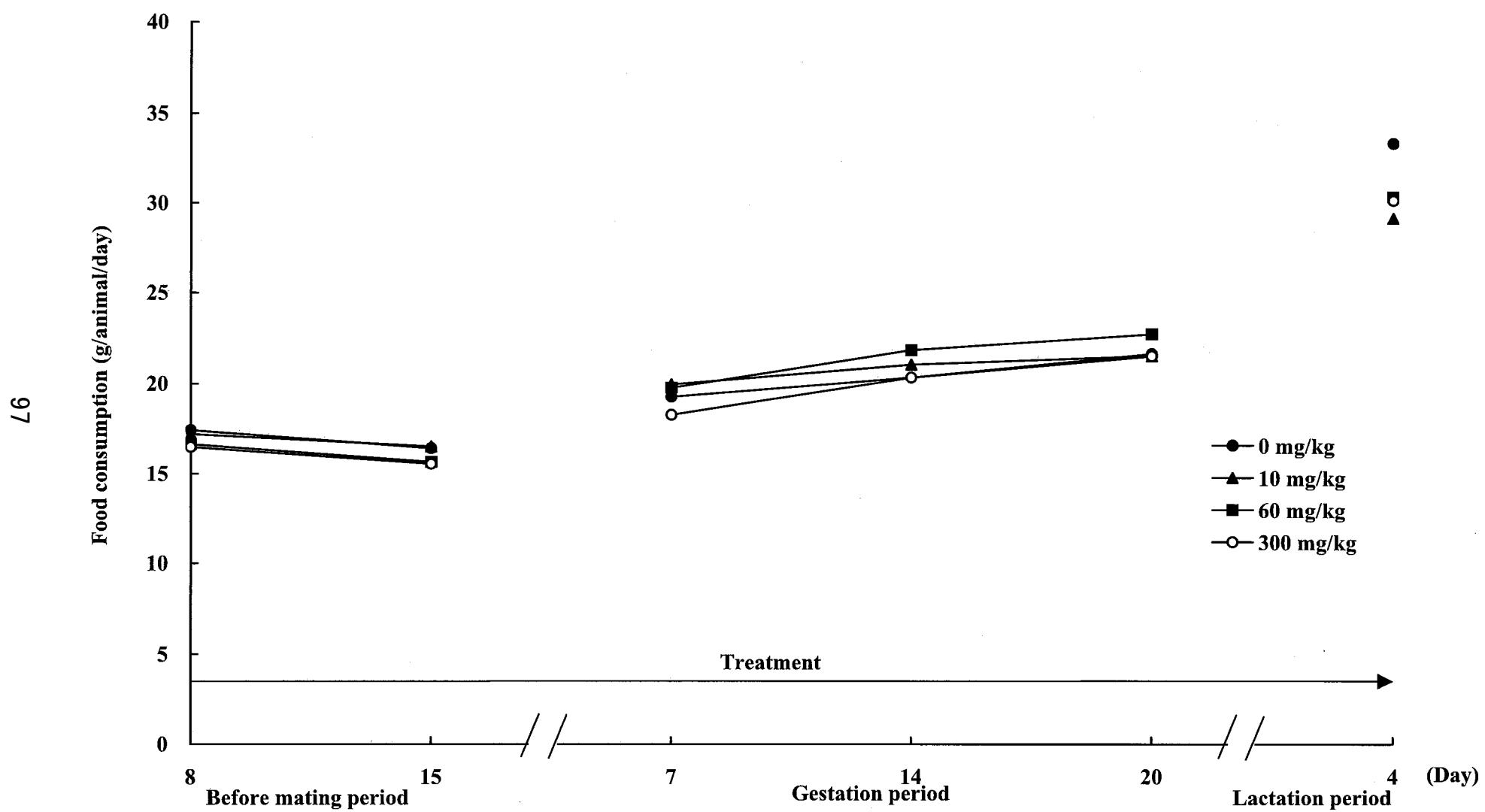


Fig.7 Food consumption of female rats treated orally with Chlorocyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

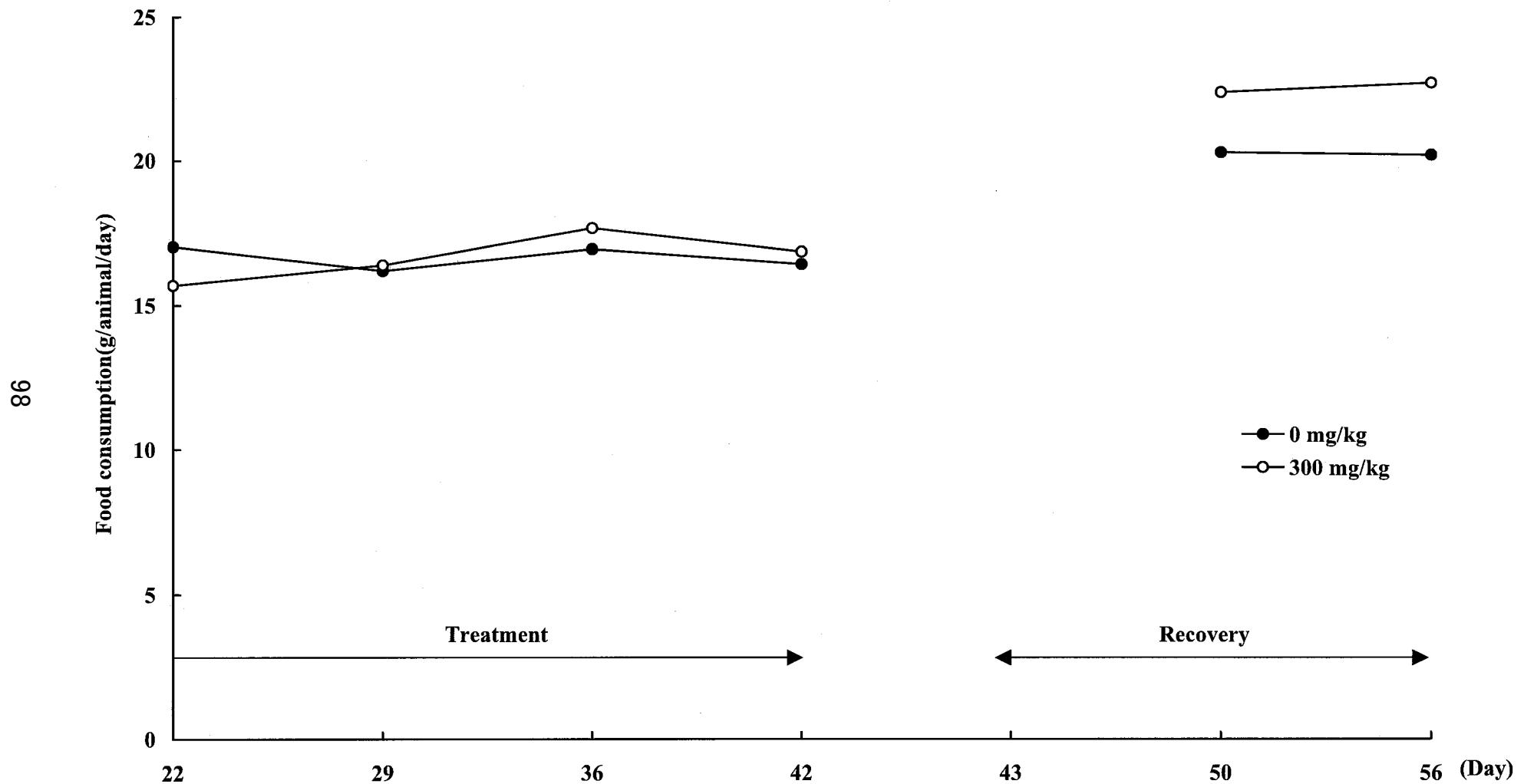


Fig.8 Food consumption of female rats (satellite animal) treated orally with Chlorocyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Clinical Sign - Summary

Study No. B041794

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
		Time	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10
CCH 0	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
CCH 10	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
CCH 60	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
CCH 300	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Salivation		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	3

+ , Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

Table 1 Clinical Sign - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Male																															
		Day	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	Time	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20			
CCH 0	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
CCH 10	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
CCH 60	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
CCH 300	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
	No Abnormality		12	7	12	6	12	7	12	5	12	6	12	5	12	6	12	5	12	4	12	5	12	5	12	6	12	5	12	6	12		
	Salivation		1	0	5	0	6	0	5	0	7	0	6	0	7	0	6	0	7	0	8	0	7	0	7	0	6	0	6	0	7	0	6

†, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
 Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

Table 1 Clinical Sign - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day Time	Male																							
			35 10	36 20	37 10	38 20	39 10	40 20	41 10	42 20	43 10	44 20	45 10	46 20	47 10	48 20	49 10	50 20	51 10	52 20	53 10	54 20	55 10	56 20	57 10	
CCH 0	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5	5	5	5	5	
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5	5	5	5	5	
CCH 10	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
CCH 60	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
CCH 300	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality		12	5	12	6	12	6	12	8	12	7	12	6	12	5	12	8	12	5	5	5	5	5	5	5
	Salivation		1	0	7	0	6	0	6	0	4	0	5	0	6	0	7	0	4	0	0	0	0	0	0	

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

Table 2 Clinical Sign - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Female																										
		Day	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Time	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20
CCH	Number of Animals		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
0	No Abnormality		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
CCH	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
10	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
CCH	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
60	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
CCH	Number of Animals		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
300	No Abnormality		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17		16	17	17	15	17	14	17	17	17	16
	Salivation		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0	2	0	3	0	0	0

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
 Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

Table 3 Clinical Sign - Summary

Female (Mating period)

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day Time	Female (Mating period)																						
			16 10	16 20	17 10	17 20	18 10	18 20	19 10	19 20	20 10	20 20	21 10	21 20	22 10	22 20	23 10	23 20	24 10	24 20	25 10	25 20	26 10	26 20	27 10
CCH 0	Number of Animals		8	8	5	5	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	No Abnormality		8	8	5	5	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CCH 10	Number of Animals		7	7	4	4	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
	No Abnormality		7	7	4	4	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
CCH 60	Number of Animals		6	6	5	5	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	No Abnormality		6	6	5	5	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CCH 300	Number of Animals		9	9	7	7	5	5																	
	No Abnormality		9	9	7	7	5	5																	

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

Table 4

Study No. B041794

Clinical Sign (F0 Gestation) - Summary
 Sex : Female Time 10 : Before dosing

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	/Day																								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
CCH 0	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	
CCH 10	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	1
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	1
CCH 60	Incomplet delivery	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	1
	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8
CCH 300	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7

Table 4
Table Continued

Study No. B041794

Clinical Sign (F0 Gestation) - Summary
Sex : Female Time 10 : Before dosing

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	/Day	
		25	26
CCH	Number of animals	1	1
10	No abnormality	0	0
	Incompleat delivery	1	1

Table 4
Table Continued

Study No. B041794

Clinical Sign (F0 Gestation) - Summary
Sex : Female Time 20 : After dosing

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	/Day																								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
CCH 0	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	
CCH 10	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	1
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	1
	Incompleat delivery																									1
CCH 60	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8
CCH 300	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7
	No abnormality	11	12	12	10	12	8	8	9	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	11	10	9	5
	Salivation	1		2	4	4	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	1	1	2	3	2	2	

Table 4
Table Continued

Study No. B041794

Clinical Sign (F0 Gestation) - Summary
Sex : Female Time 20 : After dosing

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	/Day 25
CCH	Number of animals	1
10	No abnormality	0
	Incompleat delivery	1

Table 5

Study No. B041794

Clinical Sign (F0 Lactation) - Summary
 Sex : Female Time 10 : Before dosing

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	/Day					
		0	1	2	3	4	5
CCH 0	Number of animals No abnormality	12	12	12	12	12	12
CCH 10	Number of animals No abnormality	11	11	11	11	11	11
CCH 60	Number of animals No abnormality Total litter loss Soiled perineal region	12	12	12	11	11	11
CCH 300	Number of animals No abnormality	12	12	12	12	12	12

Table 5
Table Continued

Study No. B041794

Clinical Sign (F0 Lactation) - Summary
Sex : Female Time 20 : After dosing

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	/Day				
		0	1	2	3	4
CCH 0	Number of animals	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12
CCH 10	Number of animals	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11
CCH 60	Number of animals	12	12	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11
	Soiled perineal region	1	1	1	1	1
CCH 300	Number of animals	12	12	12	12	12
	No abnormality	10	9	11	9	9
	Salivation	2	3	1	3	3

Table 6 Clinical Sign - Summary

Female #

Test Substance Dose(mg/kg)	Findings	Day	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
		Time	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10
CCH 0	Number of Animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CCH 300	Number of Animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality		5	4	5	4	5	4	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Salivation		1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

Time 10, Before dosing;

Time 20, After dosing;

: Satellite animal

Table 6 Clinical Sign - Summary

Female #

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
		Time	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	51	52	53	54	55	56
CCH 0	Number of Animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CCH 300	Number of Animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Salivation	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
 Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

: Satellite animal

Table 6 Clinical Sign - Summary

Female #

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day 57
CCH 0	Number of Animals No Abnormality	5 5
CCH 300	Number of Animals No Abnormality Salivation	5 5 1 0

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

#:Satellite animal

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week -1)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
	Home cage observations (Criteria)								
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convolution	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convolution	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal from the cage	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week -1)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations (Criteria)									
Reactivity to handling	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1	12	12	12	12	17	12	12	17
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week -1)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations		(Criteria)							
Lacrimation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	3.8	5.8	7.6	5.5	8.9	12.3	8.0	7.6
	S. D.	4.1	3.0	4.8	3.3	3.6	5.0	5.6	4.2
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	12	12	12	17	12	12	17
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	8	11	10	8	14	10	9	16
	P	4	1	2	4	3	2	3	1

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary

(Week -1)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations		(Criteria)							
Defecation		N	6	5	9	9	17	12	12
		P	6	7	3	3	0	0	0
Posture, body position		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Breathing		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement		N	12	12	12	12	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0	0
Gait		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
		6	0	0	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0	0	0
Tremor		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary

(Week -1)

Items	Sex:	Male				Female		
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60
	Dose (mg/kg):							300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12
	Open field observations (Criteria)							
	Clonic convulsion	N	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0
	Tonic convulsion	N	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0
	Stereotypy	N	12	12	12	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0
	Bizarre behaviour	N	12	12	12	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary

(Week 1)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Home cage observations		(Criteria)							
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal from the cage	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary

(Week 1)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations (Criteria)									
Reactivity to handling		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	12	12	12	12	12	12	17
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
Aggression		N	12	12	12	17	12	12	17
		P	0	0	0	0	0	0	0
Trauma		N	12	12	12	17	12	12	17
		P	0	0	0	0	0	0	0
Color of skin		N	12	12	12	17	12	12	17
		I	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur		N	12	12	12	17	12	12	17
		P	0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos		N	12	12	12	17	12	12	17
		P	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure		1	12	12	12	17	12	12	17
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva		N	12	12	12	17	12	12	17
		I	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
Secretion		N	12	12	12	17	12	12	17
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 1)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations		(Criteria)							
Lacrimation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	3.8	4.6	3.9	2.3	5.2	11.6	6.8	7.7
	S. D.	3.4	3.7	3.9	2.1	3.8	4.7	4.7	3.9
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	12	12	12	17	12	12	17
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	8	7	8	9	15	12	12	17
	P	4	5	4	3	2	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 1)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations		(Criteria)							
Defecation	N	7	7	5	7	14	12	12	17
	P	5	5	7	5	3	0	0	0
Posture, body position	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Gait	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 1)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations (Criteria)									
Clonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
3		3	0	0	0	0	0	0	0
4		4	0	0	0	0	0	0	0
5		5	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypy		N	12	12	12	17	12	12	17
P		P	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour		N	12	12	12	17	12	12	17
P		P	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 2)

Items	Sex:	Male				Female				
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH		
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300	
	Dose (mg/kg):	12	12	12	12	17	12	12	17	
	Number of Animals:									
Home cage observations		(Criteria)								
Tremor		N	12	12	12	17	12	12	17	
		1	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	
Clonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17	
		1	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	
Tonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17	
		1	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	
		3	0	0	0	0	0	0	0	
		4	0	0	0	0	0	0	0	
		5	0	0	0	0	0	0	0	
Breathing		N	12	12	12	17	12	12	17	
		1	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	
		3	0	0	0	0	0	0	0	
		4	0	0	0	0	0	0	0	
		5	0	0	0	0	0	0	0	
Hand-held observations										
Reactivity on removal from the cage		1	0	0	0	0	0	0	0	
		2	12	12	12	12	12	12	17	
		3	0	0	0	0	0	0	0	
		4	0	0	0	0	0	0	0	
		5	0	0	0	0	0	0	0	
		6	0	0	0	0	0	0	0	

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary

(Week 2)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations (Criteria)									
Reactivity to handling	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1	12	12	12	12	17	12	12	17
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary

(Week 2)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations		(Criteria)							
Lacrimation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	2.1	2.4	1.1	1.1	4.8	6.4	7.4	5.6
	S. D.	3.2	3.5	1.9	1.6	3.5	6.5	4.3	5.0
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	12	12	12	17	12	12	17
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	10	9	12	11	17	12	12	17
	P	2	3	0	1	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 2)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations	(Criteria)								
Defecation	N	5	6	5	7	17	12	12	17
	P	7	6	7	5	0	0	0	0
Posture, body position	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Gait	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 2)

Items	Sex:	Male				Female		
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60
	Dose (mg/kg):							300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12
	Open field observations (Criteria)							
	Clonic convulsion	N	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0
	Tonic convulsion	N	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0
	Stereotypy	N	12	12	12	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0
	Bizarre behaviour	N	12	12	12	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 3)

Items	Sex:	Male				Female		
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60
	Dose (mg/kg):							300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12
	Home cage observations (Criteria)							
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convolution	N	12	12	12	12	17	12	12
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convolution	N	12	12	12	12	17	12	12
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations								
Reactivity on removal from the cage	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 3)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations (Criteria)									
Reactivity to handling	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1	12	12	12	12	17	12	12	17
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 3)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations									
(Criteria)									
Lacration									
N	12	12	12	12	17	12	12	17	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	
Salivation									
N	12	12	12	12	17	12	12	17	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	
Piloerection									
N	12	12	12	12	17	12	12	17	
P	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pupil size									
N	12	12	12	12	17	12	12	17	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	
Open field observations									
Rearing									
Mean	1.3	1.0	3.3	4.4	3.2	4.9	3.0	2.4	
S. D.	2.1	2.1	4.0	2.7	3.3	4.3	3.1	2.1	
Arousal									
1	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	12	12	12	12	17	12	12	17	
4	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	
Urination									
N	12	12	12	12	14	11	11	15	
P	0	0	0	0	3	1	1	2	

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 3)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations		(Criteria)							
Defecation		N	11	12	9	12	13	12	12
		P	1	0	3	0	4	0	0
Posture, body position		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Breathing		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement		N	12	12	12	12	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0	0
Gait		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
		6	0	0	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0	0	0
Tremor		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 3)

Items	Sex:	Male				Female		
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60
	Dose (mg/kg):							300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	17
Open field observations (Criteria)								
Clonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12
1		1	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12
1		1	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0
3		3	0	0	0	0	0	0
4		4	0	0	0	0	0	0
5		5	0	0	0	0	0	0
Stereotypy		N	12	12	12	17	12	12
P		P	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour		N	12	12	12	17	12	12
P		P	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 4)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Home cage observations		(Criteria)							
Tremor		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
3		3	0	0	0	0	0	0	0
4		4	0	0	0	0	0	0	0
5		5	0	0	0	0	0	0	0
Breathing		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
3		3	0	0	0	0	0	0	0
4		4	0	0	0	0	0	0	0
5		5	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal		1	0	0	0	0	0	0	0
from the cage		2	12	12	12	17	12	12	17
3		3	0	0	0	0	0	0	0
4		4	0	0	0	0	0	0	0
5		5	0	0	0	0	0	0	0
6		6	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary

(Week 4)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations		(Criteria)							
Reactivity to handling	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1	12	12	12	12	17	12	12	17
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 4)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: CCH	CCH 0	CCH 60	CCH 300	CCH 0	CCH 10	CCH 60	CCH 300
	Dose (mg/kg):	12	12	12	12	17	12	12	17
	Number of Animals:								
Hand-held observations	(Criteria)								
Lacrimation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	3.6	3.0	3.0	3.0	2.5	6.5	6.4	5.8
	S. D.	3.4	3.2	5.1	2.7	2.6	6.5	5.0	5.3
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	12	12	12	17	12	12	17
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	11	11	11	11	16	12	11	16
	P	1	1	1	1	1	0	1	1

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 4)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations (Criteria)									
Defecation		N	7	10	12	12	14	12	12
		P	5	2	0	0	3	0	0
Posture, body position		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Breathing		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement		N	12	12	12	12	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0	0
Gait		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
		6	0	0	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0	0	0
Tremor		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 4)

Items	Sex:	Male				Female		
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60
	Dose (mg/kg):							300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12
Open field observations	(Criteria)							
Clonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypy	N	12	12	12	12	17	12	12
	P	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour	N	12	12	12	12	17	12	12
	P	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 5)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Home cage observations									
(Criteria)									
Tremor									
	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion									
	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion									
	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing									
	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal from the cage									
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary

(Week 5)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations		(Criteria)							
Reactivity to handling	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1	12	12	12	12	17	12	12	17
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 5)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations									
(Criteria)									
Lacrimation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	3.4	3.4	2.8	5.6	5.3	5.8	7.0	4.7
	S. D.	4.1	3.1	4.8	2.5	4.4	4.6	3.0	3.4
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	12	12	12	17	12	12	17
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	12	11	11	12	15	12	10	13
	P	0	1	1	0	2	0	2	4

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 5)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations	(Criteria)								
Defecation	N	9	12	11	12	16	12	12	17
	P	3	0	1	0	1	0	0	0
Posture, body position	N	12	12	12	12	17	12	12	17
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12	17
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Gait	N	12	12	12	12	17	12	12	17
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 5)

Items	Sex:	Male				Female		
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60
	Dose (mg/kg):							300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12
Open field observations	(Criteria)							
Clonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypy	N	12	12	12	12	17	12	12
	P	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour	N	12	12	12	12	17	12	12
	P	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 6)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Home cage observations		(Criteria)							
Tremor		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
3		3	0	0	0	0	0	0	0
4		4	0	0	0	0	0	0	0
5		5	0	0	0	0	0	0	0
Breathing		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
3		3	0	0	0	0	0	0	0
4		4	0	0	0	0	0	0	0
5		5	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal		1	0	0	0	0	0	0	0
from the cage		2	12	12	12	17	12	12	17
3		3	0	0	0	0	0	0	0
4		4	0	0	0	0	0	0	0
5		5	0	0	0	0	0	0	0
6		6	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 6)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations (Criteria)									
Reactivity to handling	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1	12	12	12	12	17	12	12	17
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary

(Week 6)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):	12	12	12	12	17	12	12	17
	Number of Animals:								
Hand-held observations		(Criteria)							
Lacrimation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	5.8	5.1	3.0	3.7	6.9	7.8	8.0	6.5
	S. D.	4.5	3.7	2.4	4.0	3.3	3.9	3.9	4.3
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	12	12	12	17	12	12	17
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	11	11	11	12	15	11	12	15
	P	1	1	1	0	2	1	0	2

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 6)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations	(Criteria)								
Defecation	N	10	11	11	11	17	12	12	17
	P	2	1	1	1	0	0	0	0
Posture, body position	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Gait	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 6)

Items	Sex:	Male				Female			
		CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations (Criteria)									
Clonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17
1		1	0	0	0	0	0	0	0
2		2	0	0	0	0	0	0	0
3		3	0	0	0	0	0	0	0
4		4	0	0	0	0	0	0	0
5		5	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypy		N	12	12	12	17	12	12	17
P		P	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour		N	12	12	12	17	12	12	17
P		P	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 8 Functional Tests - Summary

Items	Sex:	(Week 6)							
		Male				Female			
Test Substance:	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300	
Number of Animals:	5	5	5	5	5	5	5	5	
Sensory reactivity to stimuli	(Criteria)								
Approach response	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	5	5	4	4	5	5	5	5
	3	0	0	1	1	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Touch response	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	4	4	3	1	5	5	4	5
	3	1	1	2	4	0	0	1	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Auditory response	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	5	5	5	5	5	5	5	5
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Tail pinch response	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	5	5	4	5	5	5	5	5
	3	0	0	1	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Aerial righting reaction	1	5	5	5	5	5	5	5	5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Grip strength									
Forelimb grip strength	Mean (g)	1541.6	1278.8	1394.0	1244.6	1112.6	1080.4	1065.8	929.4
	S. D.	136.4	83.8	241.3	195.8	198.9	199.1	106.2	178.9
Hindlimb grip strength	Mean (g)	841.8	837.0	829.4	823.0	618.4	585.6	639.6	605.6
	S. D.	25.7	65.0	53.8	92.3	84.3	33.3	124.7	92.4

Significantly different from control : *, P<0.05 ; **, P<0.01
See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 9 Motor Activity - Summary

(Week 6)

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	Time: Unit:	0-10 min Count/10 min	10-20 min Count/10 min	20-30 min Count/10 min	30-40min Count/10 min	40-50min Count/10 min	50-60min Count/10 min	Total Count/1 hr
CCH 0	Mean	2557.0	1507.2	680.4	493.6	383.4	414.6	6036.2
	S. D.	575.4	927.3	559.3	948.5	762.9	811.4	4122.1
	n	5	5	5	5	5	5	5
CCH 10	Mean	2142.0	1073.4	218.6	100.8	23.2	6.6	3564.6
	S. D.	249.0	664.7	348.5	96.3	43.2	6.2	1054.5
	n	5	5	5	5	5	5	5
CCH 60	Mean	2213.2	756.0	182.2	33.0	72.0	37.2	3293.6
	S. D.	477	386.0	177.2	32.1	68.6	27.9	819.9
	n	5	5	5	5	5	5	5
CCH 300	Mean	1987.2	608.6	112.0	26.8	92.2	30.6	2857.4
	S. D.	449.8	532.1	91.9	28.2	101.5	29.3	955.7
	n	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05 ; **, P<0.01

Table 10 Motor Activity - Summary

(Week 6)

Female

Test Substance Dose (mg/kg)	Time: Unit:	0-10 min Count/10 min	10-20 min Count/10 min	20-30 min Count/10 min	30-40min Count/10 min	40-50min Count/10 min	50-60min Count/10 min	Total Count/1 hr
CCH 0	Mean	756.6	186.0	56.0	45.4	10.8	15.4	1070.2
	S. D.	721.2	374.9	35.4	28.5	11.5	15.8	1118.8
	n	5	5	5	5	5	5	5
CCH 10	Mean	1538.6	924.0	819.4	348.0	830.8	475.4	4936.2
	S. D.	502.4	623.6	1084.5	519.3	1118.3	430.9	3627.0
	n	5	5	5	5	5	5	5
CCH 60	Mean	1127.6	452.0	65.4	259.4	312.2	464.4	2681.0
	S. D.	482.4	600.7	42.6	444.4	499.8	781.3	1831.3
	n	5	5	5	5	5	5	5
CCH 300	Mean	1459.2	562.8	243.4	380.4	9.6	26.8	2682.2
	S. D.	512.3	756.7	406.3	745.7	13.3	36.4	1972.4
	n	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05 ; **, P<0.01

Table 11 Body Weight - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	Male									
		1	8	15	22	29	36	42	43	50	56
CCH 0	Mean	352.1	385.3	414.5	438.3	463.3	487.2	501.6	497.2	510.2	529.0
	S. D.	16.9	22.0	23.3	23.3	27.9	30.2	30.7	21.3	17.6	21.6
	n	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5
CCH 10	Mean	348.3	383.3	415.4	445.3	471.8	496.3	513.3			
	S. D.	16.3	17.5	21.2	25.9	29.2	32.7	36.5			
	n	12	12	12	12	12	12	12			
CCH 60	Mean	350.7	380.3	410.4	435.7	462.9	488.3	504.6			
	S. D.	18.0	25.2	31.4	32.0	37.3	42.8	46.2			
	n	12	12	12	12	12	12	12			
CCH 300	Mean	349.8	373.0	399.1	417.8	440.1	459.4	473.3	482.8	506.4	535.4
	S. D.	13.9	20.9	25.7	27.2	29.7	30.6	32.2	38.9	39.7	47.5
	n	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 12 Body Weight - Summary

Female

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	1	8	15
CCH 0	Mean	215.0	230.2	245.7
	S. D.	8.8	9.6	14.6
	n	17	17	17
CCH 10	Mean	212.3	227.9	245.7
	S. D.	6.0	12.7	18.5
	n	12	12	12
CCH 60	Mean	212.5	228.4	241.2
	S. D.	10.3	9.5	14.9
	n	12	12	12
CCH 300	Mean	211.9	225.5	234.7
	S. D.	8.9	9.9	11.3
	n	17	17	17

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 13

Study No. B041794

Body Weight (F0 Gestation) - Summary

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	0	7	14	20
CCH 0	Mean S. D. n	253.8 17.3 12	295.6 19.9 12	332.8 23.7 12	414.8 31.1 12
CCH 10	Mean S. D. n	257.5 23.7 12	296.9 22.6 12	331.2 22.6 12	405.9 29.2 12
CCH 60	Mean S. D. n	251.9 21.9 12	294.8 17.7 12	334.6 16.8 12	417.0 25.2 12
CCH 300	Mean S. D. n	243.1 13.3 12	278.4 17.6 12	313.2 22.0 12	389.8 27.7 12

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 14

Study No. B041794

Body Weight (F0 Lactation) - Summary

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	0	4
CCH 0	Mean	315.1	334.7
	S. D.	27.1	23.0
	n	12	12
CCH 10	Mean	316.5	324.9
	S. D.	19.3	23.8
	n	11	11
CCH 60	Mean	319.4	330.4
	S. D.	20.3	16.4
	n	12	11
CCH 300	Mean	299.4	313.0
	S. D.	20.1	22.8
	n	12	12

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Study No. B041794
Unit : g

Table 15 Body Weight - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	Female #						
		22	29	36	42	43	50	56
CCH 0	Mean	263.4	269.0	279.8	295.4	294.8	303.4	308.8
	S. D.	18.6	19.7	16.6	20.0	18.8	20.2	18.5
	n	5	5	5	5	5	5	5
CCH 300	Mean	246.6	254.0	265.0	275.8	276.8	291.8	306.2
	S. D.	9.3	8.1	6.0	7.0	6.9	9.6	11.1
	n	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

#:Satellite animal

Table 16 Accumulative Body Weight Gain - Summary

Test Substance Dose(mg/kg)	Day	Male									
		1	8	15	22	29	36	42	43	50	56
CCH 0	Mean	0.0	33.2	62.4	86.3	111.3	135.1	149.5	151.4	164.4	183.2
	S. D.	0.0	10.0	11.1	10.7	13.8	17.0	17.6	15.1	10.7	11.0
	n	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5
CCH 10	Mean	0.0	35.0	67.1	97.0	123.4	147.9	165.0			
	S. D.	0.0	6.6	11.5	16.1	19.1	22.4	26.3			
	n	12	12	12	12	12	12	12			
CCH 60	Mean	0.0	29.7	59.8	85.0	112.3	137.7	153.9			
	S. D.	0.0	9.2	16.3	18.4	24.5	28.7	31.5			
	n	12	12	12	12	12	12	12			
CCH 300	Mean	0.0	23.2*	49.3	67.9*	90.3*	109.6*	123.5*	130.0	153.6	182.6
	S. D.	0.0	10.2	15.8	17.3	20.8	21.3	23.0	19.7	19.7	27.9
	n	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 17 Accumulative Body Weight Gain - Summary

Female

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	1	8	15
CCH 0	Mean	0.0	15.2	30.7
	S. D.	0.0	6.5	10.8
	n	17	17	17
CCH 10	Mean	0.0	15.7	33.4
	S. D.	0.0	8.4	14.0
	n	12	12	12
CCH 60	Mean	0.0	15.9	28.7
	S. D.	0.0	4.7	9.0
	n	12	12	12
CCH 300	Mean	0.0	13.6	22.8*
	S. D.	0.0	6.8	6.2
	n	17	17	17

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 18

Study No. B041794

Body Weight Gain (F0 Gestation) - Summary
Base : Day 0 of Gestation

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	0	7	14	20
CCH 0	Mean S. D. n	0.0 0.0 12	41.8 10.5 12	79.0 16.6 12	161.0 23.5 12
CCH 10	Mean S. D. n	0.0 0.0 12	39.4 7.4 12	73.7 11.9 12	148.4 21.6 12
CCH 60	Mean S. D. n	0.0 0.0 12	42.9 7.0 12	82.7 11.5 12	165.1 23.7 12
CCH 300	Mean S. D. n	0.0 0.0 12	35.3 7.4 12	70.1 11.7 12	146.7 17.8 12

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 19

Study No. B041794

Body Weight Gain (F0 Lactation) - Summary
 Base : Day 0 of Lactation

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	0	4
CCH 0	Mean S. D. n	0.0 0.0 12	19.6 9.6 12
CCH 10	Mean S. D. n	0.0 0.0 11	8.4* 8.2 11
CCH 60	Mean S. D. n	0.0 0.0 12	7.8** 8.5 11
CCH 300	Mean S. D. n	0.0 0.0 12	13.6 9.9 12

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Study No. B041794
Unit : g

Table 20 Accumulative Body Weight Gain - Summary

Female #

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	22	29	36	42	43	50	56
CCH 0	Mean	0.0	5.6	16.4	32.0	31.4	40.0	45.4
	S. D.	0.0	3.0	12.2	12.6	12.4	12.7	18.2
	n	5	5	5	5	5	5	5
CCH 300	Mean	0.0	7.4	18.4	29.2	30.2	45.2	59.6
	S. D.	0.0	5.0	6.5	5.8	7.2	12.3	12.8
	n	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

#:Satellite animal

Table 21 Food Consumption - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	Male						
		8	15	22	29	36	38	50
CCH 0	Mean	24.23	21.68		22.22	22.63	21.79	26.92
	S. D.	2.20	1.50		1.22	1.22	1.89	1.33
	n	12	12		11	12	12	5
CCH 10	Mean	24.05	22.47		23.29	23.46	22.67	
	S. D.	2.21	2.18		2.21	2.46	1.91	
	n	12	12		10	12	12	
CCH 60	Mean	23.55	21.68		22.40	23.23	23.29	
	S. D.	2.08	2.36		2.01	2.00	2.66	
	n	12	12		11	12	12	
CCH 300	Mean	23.17	22.02		22.43	23.23	23.08	28.90
	S. D.	2.28	2.09		1.76	2.10	2.41	3.62
	n	12	12		12	12	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 22

Food Consumption - Summary

Female

Study No. B041794
Unit : g/animal/day

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	8	15
CCH 0	Mean	17.41	16.43
	S. D.	1.30	2.02
	n	17	17
CCH 10	Mean	17.19	16.53
	S. D.	2.23	2.58
	n	12	12
CCH 60	Mean	16.63	15.67
	S. D.	1.17	1.55
	n	12	12
CCH 300	Mean	16.49	15.56
	S. D.	1.35	0.82
	n	17	17

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 23

Study No. B041794

Food Consumption (F0 Gestation) - Summary

Unit : g/animal/day

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	7	14	20
CCH 0	Mean S. D. n	19.3 2.2 12	20.4 2.3 12	21.7 2.1 12
CCH 10	Mean S. D. n	20.0 2.2 12	21.1 2.0 12	21.6 2.0 12
CCH 60	Mean S. D. n	19.8 1.6 12	21.9 2.0 12	22.8 1.9 12
CCH 300	Mean S. D. n	18.3 2.2 12	20.4 2.0 12	21.6 2.1 12

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 24

Study No. B041794

Food Consumption (F0 Lactation) - Summary

Unit : g/animal/day

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	4
CCH 0	Mean S. D. n	33.5 3.9 12
CCH 10	Mean S. D. n	29.3 3.3 11
CCH 60	Mean S. D. n	30.5 4.4 11
CCH 300	Mean S. D. n	30.3 4.2 12

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 25

Food Consumption - Summary

Female #

Study No. B041794
Unit : g/animal/day

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	22	29	36	42	50	56
CCH 0	Mean	17.02	16.20	16.96	16.46	20.36	20.28
	S. D.	1.85	1.61	2.00	1.31	2.15	1.76
	n	5	5	5	5	5	5
CCH 300	Mean	15.68	16.40	17.68	16.88	22.46	22.80
	S. D.	1.53	0.93	1.19	1.39	1.57	1.70
	n	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.
#:Satellite animal

Table 26 Hematology - Summary

Male

Test Substance Dose(mg/kg)	Red Blood Cell Count x10E6/ μ L		Hemoglobin conc. g/dL		Hematocrit %		MCV fL		MCH pg		MCHC %		Platelet Count x10E3/ μ L		Reticulocyte Ratio %		PT sec		
			Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	
CCH	Mean	8.298	8.548	15.58	15.38	45.48	45.36	54.80	53.12	18.74	18.00	34.24	33.94	1055.6	970.4	2.58	2.64	24.30	22.98
0	S. D.	0.118	0.224	0.27	0.26	0.84	1.19	1.34	2.54	0.45	0.52	0.22	0.72	163.6	73.1	0.13	0.11	5.16	3.39
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
CCH	Mean	8.618		15.46		45.88		53.26		17.94		33.68		972.0		2.40		21.90	
10	S. D.	0.203		0.51		1.14		0.84		0.39		0.60		131.7		0.57		1.90	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	8.318		15.32		44.96		54.06		18.44		34.10		974.8		2.48		25.16	
60	S. D.	0.219		0.31		1.36		0.36		0.18		0.45		93.4		0.29		4.83	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	8.512	8.440	15.42	15.12	45.40	44.14	53.44	52.32	18.14	17.94	33.94	34.26	985.8	1013.0	3.26*	2.30*	20.72	25.22
300	S. D.	0.487	0.285	0.54	0.46	1.80	1.37	2.24	1.82	0.84	0.44	0.38	0.57	104.4	89.6	0.35	0.23	2.30	3.94
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 26 Hematology - Summary

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	APTT		
			sec
	Day 43	Day 57	
CCH	Mean	22.88	20.98
0	S. D.	2.35	1.58
	n	5	5
CCH	Mean	21.46	
10	S. D.	1.79	
	n	5	
CCH	Mean	23.78	
60	S. D.	3.17	
	n	5	
CCH	Mean	20.24	21.48
300	S. D.	1.67	2.75
	n	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 26 Hematology - Summary

Male

Test Substance White Blood
 Dose(mg/kg) Cell Count
 $\times 10^3/\mu\text{L}$

Day 43 Day 57

CCH	Mean	8.868	7.792
0	S. D.	2.381	0.868
	n	5	5
CCH	Mean	9.406	
10	S. D.	1.529	
	n	5	
CCH	Mean	9.968	
60	S. D.	1.451	
	n	5	
CCH	Mean	9.668	7.536
300	S. D.	1.353	0.731
	n	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 26 Hematology - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Male												
	Lymphocyte		Neutrophilic Segmented		Neutrophilic Band		Eosinophil		Basophil		Monocyte		
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	
CCH	Mean	89.16	85.94	8.04	10.24	0.00	0.00	1.00	0.60	0.00	0.00	1.80	3.22
	0 S.D.	2.77	4.83	4.37	4.97	0.00	0.00	0.71	0.89	0.00	0.00	1.64	1.96
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CCH	Mean	83.40		13.60		0.40		0.60		0.00		2.00	
	10 S.D.	2.41		1.14		0.55		0.55		0.00		1.58	
	n	5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	85.96		11.84		0.00		1.00		0.00		1.20	
	60 S.D.	3.68		3.18		0.00		1.22		0.00		0.84	
	n	5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	87.50	85.56	10.30	11.24	0.00	0.00	1.40	0.20	0.00	0.00	0.80	3.00
	300 S.D.	4.34	5.46	5.04	4.77	0.00	0.00	0.55	0.45	0.00	0.00	0.45	1.00
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 27 Hematology - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)		Female															
		Red Blood Cell Count x10E6/ μ L		Hemoglobin conc. g/dL		Hematocrit %		MCV fL		MCH pg		MCHC %		Platelet Count x10E3/ μ L		Reticulocyte Ratio %	
		Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57
CCH	Mean	6.850	8.370	13.16	15.30	39.24	44.12	57.38	52.74	19.30	18.30	33.64	34.70	1078.2	1049.8	6.10	2.36
	S.D.	0.453	0.333	0.43	0.42	1.54	0.97	2.79	1.92	0.87	0.69	0.30	0.37	140.2	132.4	1.87	0.36
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CCH	Mean	6.790		13.16		38.52		56.72		19.36		34.12		1172.8		6.08	
	S.D.	0.158		0.34		1.09		0.68		0.25		0.28		151.5		1.32	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	6.758		13.16		38.98		57.74		19.46		33.72		1132.4		6.58	
	S.D.	0.215		0.51		0.94		2.25		0.82		0.64		158.0		1.73	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	6.926	7.964	13.56	15.26	39.74	43.92	57.44	55.16	19.60	19.16	34.12	34.76	1162.2	985.8	6.00	2.40
	S.D.	0.564	0.259	0.81	0.55	3.08	1.78	1.95	1.66	0.65	0.57	0.64	0.19	184.6	162.7	1.54	0.65
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 27 Hematology - Summary

Female

Study No. B041794

Test Substance		APTT	
Dose (mg/kg)		sec	
		Day 43	Day 57
CCH	Mean	16.18	15.22
0	S. D.	1.14	1.77
	n	5	5
CCH	Mean	15.60	
10	S. D.	1.00	
	n	5	
CCH	Mean	15.90	
60	S. D.	0.83	
	n	5	
CCH	Mean	15.52	15.08
300	S. D.	0.73	0.97
	n	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 27 Hematology - Summary

Female

Test Substance White Blood
 Dose (mg/kg) Cell Count
 $\times 10^3/\mu\text{L}$

Day 43 Day 57

CCH	Mean	8.410	5.700
0	S. D.	2.005	0.681
n		5	5
CCH	Mean	9.860	
10	S. D.	0.608	
n		5	
CCH	Mean	9.698	
60	S. D.	2.926	
n		5	
CCH	Mean	9.136	7.276
300	S. D.	0.713	2.319
n		5	5

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 27 Hematology - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Female												
	Lymphocyte		Neutrophilic Segmented		Neutrophilic Band		Eosinophil		Basophil		Monocyte		
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	
CCH	Mean	73.66	90.58	23.32	8.02	0.20	0.00	0.20	0.60	0.00	0.00	2.62	0.80
0	S. D.	5.54	5.66	5.55	5.03	0.45	0.00	0.45	0.89	0.00	0.00	2.18	0.84
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CCH	Mean	70.54		26.26		0.60		0.40		0.00		2.20	
10	S. D.	4.24		4.18		0.89		0.89		0.00		1.79	
	n	5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	65.90		31.30		0.20		0.40		0.00		2.20	
60	S. D.	11.59		11.23		0.45		0.55		0.00		1.79	
	n	5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	76.80	91.58	19.80	6.62	0.60	0.00	0.20	0.20	0.00	0.00	2.60	1.60
300	S. D.	7.85	4.83	7.40	4.45	0.89	0.00	0.45	0.45	0.00	0.00	2.07	0.89
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 28 Blood Chemistry - Summary

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	ASAT (GOT)		ALAT (GPT)		γ GT		ALP		Total Bilirubin mg/dL	Urea Nitrogen mg/dL		Creatinine mg/dL		Glucose mg/dL		Total Cholesterol mg/dL	
	U/L		U/L		U/L		U/L			mg/dL		mg/dL		mg/dL		mg/dL	
		Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57
CCH	Mean	98.0	114.4	23.2	29.8	0.4	1.4	406.8	318.0	0.10	0.08	12.18	13.72	0.30	0.30	131.8	125.8
	S. D.	22.3	21.5	3.1	4.5	0.5	0.5	144.7	51.9	0.00	0.04	1.38	1.48	0.00	0.07	7.8	8.8
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CCH	Mean	99.6		32.2		1.0		365.6		0.10		13.62		0.30		146.2	
	S. D.	22.4		12.3		0.7		70.0		0.00		1.73		0.07		17.7	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	88.4		26.0		0.6		384.8		0.08		12.18		0.28		145.0	
	S. D.	15.6		5.4		0.5		69.2		0.04		1.76		0.08		11.0	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	96.6	109.6	29.8	29.4	1.0	1.6	414.4	287.6	0.10	0.06	11.74	14.06	0.26	0.24	124.4	130.4
	S. D.	19.3	16.6	8.6	4.6	0.7	0.5	52.8	50.5	0.00	0.05	1.32	1.06	0.05	0.05	15.0	11.2
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 28 Blood Chemistry - Summary

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	Triglyceride		Total Protein		Albumin		A/G Ratio		Calcium		Inorganic Phosphorus		Na		K		Cl		
	mg/dL	g/dL	g/dL	mg/dL	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	mg/dL	mmol/L	mmol/L	Day 43	Day 57	mmol/L	mmol/L		
CCH	Mean	30.2	29.0	6.62	6.70	3.04	3.02	0.848	0.826	9.94	9.82	8.20	7.96	148.2	149.0	4.80	4.46	105.0	106.2
0	S. D.	15.4	9.5	0.24	0.14	0.11	0.11	0.019	0.078	0.23	0.19	0.36	0.83	1.1	0.7	0.23	0.19	1.2	0.8
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CCH	Mean	49.6		6.80		3.08		0.832		10.12		7.72		148.0		4.68		105.2	
10	S. D.	32.8		0.32		0.13		0.036		0.28		0.72		0.0		0.26		0.8	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	37.8		6.70		3.06		0.844		10.02		7.94		148.8		4.54		106.2	
60	S. D.	10.2		0.37		0.05		0.079		0.37		0.68		0.8		0.21		0.8	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	24.6	40.6	6.70	6.72	3.08	3.08	0.856	0.836	9.98	10.06	8.74	7.66	148.6	148.8	4.72	4.64	105.2	106.2
300	S. D.	8.4	13.6	0.12	0.23	0.04	0.08	0.027	0.034	0.36	0.34	0.55	0.48	0.9	0.8	0.11	0.23	1.3	1.3
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 29 Blood Chemistry - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Female																	
	ASAT (GOT) U/L		ALAT (GPT) U/L		γ GT U/L		ALP U/L		Total Bilirubin mg/dL		Urea Nitrogen mg/dL		Creatinine mg/dL		Glucose mg/dL		Total Cholesterol mg/dL	
	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57		
CCH	Mean	142.4	126.0	53.8	22.0	1.0	2.2	356.0	144.0	0.08	0.10	19.18	14.18	0.36	0.32	135.8	137.8	
0	S. D.	27.2	17.9	10.1	4.2	0.0	0.4	178.0	48.8	0.04	0.00	2.42	2.31	0.05	0.04	9.9	9.9	
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
CCH	Mean	116.0		38.6		1.4		238.0		0.06		20.42		0.38		124.2		
10	S. D.	20.5		6.6		0.9		43.3		0.05		5.43		0.08		7.7		
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		
CCH	Mean	142.8		46.0		0.6		239.4		0.06		18.00		0.40		124.8		
60	S. D.	23.0		6.6		0.5		60.2		0.05		2.14		0.00		8.8		
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		
CCH	Mean	139.2	108.8	50.0	20.8	1.0	1.4*	293.0	165.4	0.06	0.10	22.16	15.74	0.32	0.32	134.4	126.4	
300	S. D.	26.2	21.5	9.3	2.6	1.0	0.5	107.7	31.0	0.05	0.00	2.51	2.27	0.08	0.04	10.1	12.4	
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		

Significantly different from control

*: P<0.05; **, P<0.01.

Table 29 Blood Chemistry - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Female																		
	Triglyceride mg/dL		Total Protein g/dL		Albumin g/dL		A/G Ratio		Calcium mg/dL		Inorganic Phosphorus mg/dL		Na mmol/L		K mmol/L		Cl mmol/L		
	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	
CCH	Mean	65.2	17.2	6.78	7.24	3.02	3.50	0.818	0.932	11.38	10.32	10.38	7.74	146.4	147.2	4.84	4.64	102.0	106.0
0	S. D.	30.5	6.2	0.41	0.56	0.18	0.34	0.048	0.055	0.51	0.36	0.89	0.62	0.9	1.3	0.39	0.21	1.6	2.4
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
CCH	Mean	57.4		6.28		2.94		0.890		10.94		10.16		146.4		4.52		105.0	
10	S. D.	27.0		0.50		0.29		0.086		0.51		0.49		0.5		0.16		2.6	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	39.4		6.74		3.12		0.862		11.14		10.20		146.8		4.76		103.4	
60	S. D.	16.9		0.17		0.26		0.086		0.40		1.01		0.8		0.25		3.0	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
CCH	Mean	59.6	16.2	6.74	7.16	3.16	3.42	0.880	0.932	10.82	10.34	8.66*	8.36	147.0	147.0	4.48	4.78	105.4	105.6
300	S. D.	49.5	5.0	0.38	0.22	0.27	0.29	0.074	0.095	0.29	0.28	0.85	0.57	1.4	1.9	0.25	0.24	1.9	2.2
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 30 Urinalysis - Summary

Study No. B041794

Test Substance Dose (mg/kg)	pH								Protein				Glucose				Ketones				Bilirubin				Occult Blood											
	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	>=9	-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+			
										-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+			
										Day	38	Day	38	Day	38	Day	38	Day	38	Day	38	Day	38	Day	38	Day	38	Day	38	Day	38	Day	38			
CCH																																				
	0	n	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	1	4	0	5	0	0	0	0	0	0	3	2	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	
CCH	10	n	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	2	3	0	5	0	0	0	0	0	1	3	1	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	
CCH	60	n	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	5	0	4	1	0	0	0	0	0	3	2	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	
CCH	300	n	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	0	4	1	0	5	0	0	0	0	0	1	3	1	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 30 Urinalysis - Summary

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	Urobilinogen EU/dl	0.1	1.0	2.0	4.0	>=8
	Day 38					
CCH 0	n	4	1	0	0	0
CCH 10	n	4	1	0	0	0
CCH 60	n	2	3	0	0	0
CCH 300	n	4	1	0	0	0

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 31 Organ Weight - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)		Male																	
		Final Body Weight		Brain		Thymus		Heart		Liver		Spleen		Kidneys		Adrenals		Testes	
		g		g	Day 43	Day 57	mg	Day 43	Day 57	g	Day 43	Day 57	g	Day 43	Day 57	mg	Day 43	Day 57	g
CCH	Mean	483.7	500.0	2.144	2.142	336.6	360.8	1.562	1.696	12.074	12.786	0.804	0.834	3.004	3.334	60.56	56.62	3.497	3.434
	S.D.	36.4	21.0	0.054	0.076	66.2	81.9	0.123	0.109	1.622	0.747	0.099	0.139	0.214	0.199	9.72	5.16	0.349	0.141
	n	7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	5
CCH	Mean	489.0		2.112		280.0		1.642		12.992		0.800		2.816		59.98		3.359	
	S.D.	34.5		0.051		92.9		0.123		2.161		0.137		0.128		8.04		0.332	
	n	12		5		5		5		5		5		5		5		12	
CCH	Mean	479.8		2.150		327.2		1.490		12.836		0.876		3.184		65.40		3.361	
	S.D.	43.9		0.143		21.6		0.127		1.974		0.149		0.273		6.18		0.555	
	n	12		5		5		5		5		5		5		5		12	
CCH	Mean	436.6	499.6	2.072	2.102	300.6	335.6	1.582	1.724	12.318	14.326	0.806	0.806	3.326	3.756	56.46	53.56	3.493	3.246
	S.D.	24.5	43.5	0.051	0.067	50.8	67.7	0.165	0.185	1.288	1.793	0.098	0.075	0.279	0.535	3.85	7.00	0.221	0.745
	n	7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	5	

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 31 Organ Weight - Summary

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	Epididymides			
		Day 43	Day 57	g
CCH	Mean	1.299	1.350	
0	S. D.	0.112	0.091	
	n	7	5	
CCH	Mean	1.258		
10	S. D.	0.146		
	n	12		
CCH	Mean	1.291		
60	S. D.	0.176		
	n	12		
CCH	Mean	1.299	1.292	
300	S. D.	0.109	0.274	
	n	7	5	

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 32

Study No. B041794

Organ Weight - Summary (FO Delivered-on Weaning)
Sex : Female

Test Dose	Substance	F. B. W. (g)	Brain (g)	Thymus (mg)	Heart (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Kidneys (g)	Adrenals (mg)
CCH	0	Mean S. D. n	305.8 27.0 5	1.966 0.069 5	214.2 71.3 5	1.084 0.047 5	10.866 0.786 5	0.708 0.086 5	2.072 0.148 5
CCH	10	Mean S. D. n	295.4 24.5 5	1.884 0.042 5	253.8 23.0 5	1.036 0.099 5	10.494 1.544 5	0.750 0.109 5	1.854 0.115 5
CCH	60	Mean S. D. n	299.0 12.8 5	1.922 0.036 5	232.6 76.2 5	1.032 0.077 5	10.664 0.932 5	0.808 0.271 5	1.968 0.186 5
CCH	300	Mean S. D. n	286.0 17.4 5	1.884 0.070 5	228.6 62.9 5	0.942* 0.057 5	10.890 0.576 5	0.658 0.092 5	2.006 0.134 5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 33 Organ Weight - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Female #							
	Final Body Weight		Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidneys
	g Day 57	g Day 57	mg Day 57	g Day 57	g Day 57	g Day 57	g Day 57	mg Day 57
CCH	Mean	289.8	1.952	273.2	0.968	7.484	0.468	1.828
0	S. D.	19.5	0.030	38.6	0.057	0.565	0.094	66.86
	n	5	5	5	5	5	5	12.71
CCH	Mean	282.2	1.910	304.6	0.924	7.812	0.596*	1.886
300	S. D.	11.8	0.029	36.7	0.059	0.573	0.076	69.92
	n	5	5	5	5	5	5	12.29

Significantly different from control

*: P<0.05; **, P<0.01.

: Satellite animal

Table 34 Relative Organ Weight - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)		Male																		
		Final Body Weight		Brain		Thymus		Heart		Liver		Spleen		Kidneys		Adrenals		Testes		
		g	%	Day 43	Day 57	x10 ⁻³ %	Day 43	Day 57	%	Day 43	Day 57	%	Day 43	Day 57	%	Day 43	Day 57	x10 ⁻³ %	Day 43	Day 57
CCH	0	Mean	483.7	500.0	0.448	0.428	69.92	72.42	0.326	0.340	2.516	2.558	0.168	0.166	0.628	0.668	12.56	11.32	0.726	0.688
		S. D.	36.4	21.0	0.038	0.022	9.47	16.78	0.018	0.034	0.144	0.049	0.029	0.021	0.049	0.040	0.98	0.83	0.082	0.028
		n	7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	5
CCH	10	Mean	489.0		0.448		58.40		0.346		2.732		0.168		0.596		12.72		0.692	
		S. D.	34.5		0.028		15.54		0.023		0.317		0.031		0.040		1.93		0.092	
		n	12		5		5		5		5		5		5		5		12	
CCH	60	Mean	479.8		0.460		70.24		0.318		2.726		0.188		0.678		14.06		0.705	
		S. D.	43.9		0.016		9.06		0.015		0.215		0.041		0.066		2.02		0.124	
		n	12		5		5		5		5		5		5		5		12	
CCH	300	Mean	436.6	499.6	0.474	0.424	68.36	66.82	0.362	0.344	2.808	2.860**	0.186	0.160	0.762**	0.750*	12.92	10.68	0.803	0.650
		S. D.	24.5	43.5	0.034	0.030	8.76	9.32	0.035	0.009	0.196	0.131	0.027	0.007	0.067	0.062	1.00	0.66	0.052	0.142
		n	7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	5	

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 34 Relative Organ Weight - Summary

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	Epididymides			
	%	Day 43	Day 57	
CCH	Mean	0.270	0.270	
0	S. D.	0.037	0.012	
	n	7	5	
CCH	Mean	0.259		
10	S. D.	0.039		
	n	12		
CCH	Mean	0.270		
60	S. D.	0.038		
	n	12		
CCH	Mean	0.297	0.258	
300	S. D.	0.021	0.054	
	n	7	5	

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 35

Study No. B041794

Relative Organ Weight - Summary (F0 Delivered-on Weaning)
Sex : Female

Unit : g/100gBW

Test Substance	F. B. W. (g)	Brain (x10 ⁻³)	Thymus (x10 ⁻³)	Heart	Liver	Spleen	Kidneys	Adrenals (x10 ⁻³)
CCH 0	Mean S. D. n	305.8 27.0 5	0.646 0.048 5	68.98 18.05 5	0.356 0.027 5	3.568 0.295 5	0.232 0.028 5	0.680 0.062 5
CCH 10	Mean S. D. n	295.4 24.5 5	0.642 0.053 5	86.40 10.77 5	0.348 0.015 5	3.536 0.238 5	0.254 0.026 5	0.628 0.020 5
CCH 60	Mean S. D. n	299.0 12.8 5	0.642 0.023 5	77.26 22.89 5	0.346 0.021 5	3.562 0.213 5	0.268 0.080 5	0.658 0.038 5
CCH 300	Mean S. D. n	286.0 17.4 5	0.662 0.053 5	79.60 19.25 5	0.330 0.020 5	3.818 0.245 5	0.230 0.025 5	0.702 0.050 5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 36 Relative Organ Weight - Summary

		Female #							
Test Substance	Dose (mg/kg)	Final Body Weight g Day 57	Brain % Day 57	Thymus x10 ⁻³ % Day 57	Heart % Day 57	Liver % Day 57	Spleen % Day 57	Kidneys % Day 57	Adrenals x10 ⁻³ % Day 57
CCH	Mean	289.8	0.678	93.94	0.332	2.584	0.160	0.628	23.02
	S. D.	19.5	0.048	8.69	0.016	0.096	0.024	0.041	3.80
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
CCH	Mean	282.2	0.676	108.20	0.330	2.766*	0.212*	0.666	24.74
	S. D.	11.8	0.030	14.53	0.010	0.120	0.026	0.019	3.98
	n	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control

*: P<0.05; **, P<0.01.

#: Satellite animal

Table 37 Necropsy Findings - Summary

Organ Findings		Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals Number of Animals Examined	Scheduled Sacrifice								
			Male				Female				
			CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	
			0	10	60	300	0	10	60	300	
			mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	
			7	12	12	7	12	12	12	12	
Thymus			<7>								
Small			0	0	0	0	0	0	1	0	
Liver			Abnormal lobation								
			0	0	0	0	1	0	0	0	
Nodule			Nodule								
			2	0	0	0	0	0	0	0	
Testis			Small								
			0	0	1	0					
Soft			Soft								
			0	0	1	0					
Epididymis			Small								
			0	0	1	0					
Yellowish change			0	0	1	0					

Table 37 Necropsy Findings - Summary

		Not delivery and Total litter loss							
Organ Findings	Sex	Male				Female			
	Test Substance	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH	CCH
	Dose	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose Unit	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	Number of Animals	7	12	12	7	12	12	12	12
	Number of Animals Examined	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<1>	<1>	<0>
Thymus									
Small							0	1	
Spleen									
Small							0	1	
Ovary									
Cystic dilatation							1	0	
Uterus									
Fetal rest							1	0	

Table 37 Necropsy Findings - Summary

Scheduled Sacrifice (Recovery)

Organ Findings	Sex	Male	Female		mg/kg
	Test Substance	CCH	CCH	CCH	
	Dose	0	300	0	
	Dose Unit	mg/kg	mg/kg	mg/kg	
	Number of Animals	5	5	5	
	Number of Animals Examined	<5>	<5>	<5>	
Testis Small		0	1		

Table 38 Histological Findings - Summary

Scheduled Sacrifice

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male CCH 0 mg/kg 7	Scheduled Sacrifice							
			CCH 10 mg/kg 12	CCH 60 mg/kg 12	CCH 300 mg/kg 7	Female CCH 0 mg/kg 12	CCH 10 mg/kg 12	CCH 60 mg/kg 12	CCH 300 mg/kg 12	
Grade										
Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>	
Cell infiltration, inflammatory		1 3			2	2			2	
		2 0			0	0			0	
		3 0			0	0			0	
		4 0			0	0			0	
Lymph node, mandibular		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>	
Lymph node, mesenteric		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>	
Thymus Atrophy		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<1>	<5>	
	1 0				0	3		0	3	
	2 0				0	0		1	0	
	3 0				0	0		0	0	
	4 0				0	0		0	0	
Spleen		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>	
Extramedullary hematopoiesis, erythrocytic		1 0			0	3			4	
	2 0				0	0			0	
	3 0				0	0			0	
	4 0				0	0			0	
Bone marrow, femur		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>	

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male CCH 0 mg/kg 7	Scheduled Sacrifice							
			CCH				Female			
			10 mg/kg 12	60 mg/kg 12	300 mg/kg 7	12 mg/kg 12	0 mg/kg 12	10 mg/kg 12	60 mg/kg 12	300 mg/kg 12
Grade			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Trachea			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Dilatation, tracheal gland	1	0				0	0			1
	2	0				0	0			0
	3	0				0	0			0
	4	0				0	0			0
Lung (and bronchus)			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Accumulation, foam cell, alveolus	1	1				2	2			2
	2	0				0	0			0
	3	0				0	0			0
	4	0				0	0			0
Hemorrhage	1	1				0	1			0
	2	0				0	0			0
	3	0				0	0			0
	4	0				0	0			0
Metaplasia, osseous	1	0				0	1			0
	2	0				0	0			0
	3	0				0	0			0
	4	0				0	0			0
Mineralization, arterial wall	1	0				0	0			1
	2	0				0	0			0
	3	0				0	0			0
	4	0				0	0			0

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male CCH 0 mg/kg 7	Scheduled Sacrifice					
			CCH 10 mg/kg 12	CCH 60 mg/kg 12	CCH 300 mg/kg 7	Female CCH 0 mg/kg 12	CCH 10 mg/kg 12	CCH 60 mg/kg 12
			Grade	<5>	<0>	<0>	<5>	<0>
Stomach								
Ectopic pancreatic tissue		1	0		0	1		0
		2	0		0	0		0
		3	0		0	0		0
		4	0		0	0		0
Small intestine, duodenum			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>
Small intestine, jejunum			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>
Small intestine, ileum			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>
Large intestine, cecum			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>
1								
Large intestine, colon			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>
Large intestine, rectum			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>
Liver			<5>	<0>	<0>	<5>	<6>	<0>
Cell infiltration, inflammatory, focal		1	2		2	2		1
		2	0		0	0		0
		3	0		0	0		0
		4	0		0	0		0
Fatty change, hepatocyte, focal		1	2		0	0		0
		2	0		0	0		0
		3	0		0	0		0
		4	0		0	0		0

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male CCH 0 mg/kg 7	Scheduled Sacrifice					
			CCH 10 mg/kg 12	CCH 60 mg/kg 12	CCH 300 mg/kg 7	Female CCH 0 mg/kg 12	CCH 10 mg/kg 12	CCH 60 mg/kg 12
			Grade	<5>	<0>	<0>	<5>	<6>
Liver				<5>	<0>	<0>	<5>	<6>
Vacuolation, hepatocyte, perilobular		1	2			1	0	0
		2	0			0	0	0
		3	0			0	0	0
		4	0			0	0	0
Kidney			<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Basophilic tubule, proximal tubule		1	4	1	2	1	3	1
		2	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0
Cast, hyaline, tubule		1	1	0	1	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0
Cell infiltration, lymphocyte, interstitium		1	1	2	0	2	1	0
		2	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0
Hyaline droplet, proximal tubular epithelium		1	0	1	1	0	** 0	0
		2	0	0	0	5	0	0
		3	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0

◇, Number of animals examined

1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Significantly different from control : **, P<0.01.

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Scheduled Sacrifice							
		Male				Female			
		CCH 0 mg/kg 7	CCH 10 mg/kg 12	CCH 60 mg/kg 12	CCH 300 mg/kg 7	CCH 0 mg/kg 12	CCH 10 mg/kg 12	CCH 60 mg/kg 12	CCH 300 mg/kg 12
Urinary bladder	Grade	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Cell infiltration, lymphocyte, lamina propria	1	0	0	0	1	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyperplasia, mucosal epithelium	1	0	0	2	4	*	0	0	4
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Testis		<5>	<0>	<1>	<5>				
Atrophy, seminiferous tubular epithelium	1	1	0	0					
	2	0	1	0					
	3	0	0	0					
	4	0	0	0					
Epididymis		<5>	<0>	<2>	<5>				
Cell debris, duct	1	0	0	1	0				
	2	0	0	0	0				
	3	0	0	0	0				
	4	0	0	0	0				
Cell infiltration, lymphocyte, focal	1	0	0	0	1				
	2	0	0	0	0				
	3	0	0	0	0				
	4	0	0	0	0				

◇, Number of animals examined

1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Significantly different from control : *, P<0.05.

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male CCH 0 mg/kg 7	Scheduled Sacrifice					
			CCH			Female		
			10 mg/kg 12	60 mg/kg 12	300 mg/kg 7	0 mg/kg 12	10 mg/kg 12	60 mg/kg 12
Grade			<5>	<0>	<2>	<5>		
Epididymis								
Decrease, sperm, duct		1	0		0	0		
		2	0		1	0		
		3	0		0	0		
		4	0		0	0		
Granulomatous inflammation, spermatic		1	0		1	0		
		2	0		0	0		
		3	0		0	0		
		4	0		0	0		
Seminal vesicle			<5>	<0>	<0>	<5>		
Prostate			<5>	<0>	<0>	<5>		
Cell infiltration, lymphocyte, interstitium		1	2		3			
		2	0		0			
		3	0		0			
		4	0		0			
Coagulating gland			<5>	<0>	<0>	<5>		
Ovary						<5>	<0>	<0>
Uterus						<5>	<0>	<0>
Vagina						<5>	<0>	<5>

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Scheduled Sacrifice

Organ Findings	Sex	Test Substance	Male				Female			
			CCH 0	CCH 10	CCH 60	CCH 300	CCH 0	CCH 10	CCH 60	CCH 300
	Dose	mg/kg	7	12	7	12	7	12	12	12
	Dose Unit	Number of Animals	Grade							
Pituitary			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Aberrant craniopharyngeal tissue, posterior lobe			1	0			0	0		1
			2	0			0	0		0
			3	0			0	0		0
			4	0			0	0		0
Thyroid			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Ectopic thymic tissue			1	1			0	2		0
			2	0			0	0		0
			3	0			0	0		0
			4	0			0	0		0
Ultimobranchial remnant			1	2			2	1		2
			2	0			0	0		0
			3	0			0	0		0
			4	0			0	0		0
Parathyroid			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Adrenal			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Accessory adrenocortical tissue			1	1			0	0		1
			2	0			0	0		0
			3	0			0	0		0
			4	0			0	0		0

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Scheduled Sacrifice

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male CCH 0 mg/kg 7	Scheduled Sacrifice				Female CCH 0 mg/kg 12	CCH 10 mg/kg 12	CCH 60 mg/kg 12	CCH 300 mg/kg 12
			CCH 10 mg/kg 12	CCH 60 mg/kg 12	CCH 300 mg/kg 7	CCH 10 mg/kg 12				
Adrenal		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<0>	<5>
Fatty change, fascicular zone, focal	1	1			0	0				0
	2	0			0	0				0
	3	0			0	0				0
	4	0			0	0				0
Brain		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<0>	<5>
Spinal cord		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<0>	<5>
Sciatic nerve		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<0>	<5>

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Not delivery and Total litter loss

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male CCH 0 mg/kg 7	CCH		CCH		Female CCH 0 mg/kg 12		CCH	
			mg/kg 10 12	mg/kg 60 12	mg/kg 300 7	mg/kg 12	mg/kg 10 12	mg/kg 60 12	mg/kg 300 12	
Grade		<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<1>	<0>
Thymus Atrophy	1								0	
	2								0	
	3								1	
	4								0	
Ovary Cell infiltration, inflammatory, bursa	1	<0>		<0>		<0>		<0>	<1>	
	2								1	
	3								0	
	4								0	
Dilatation, bursa	1								1	
	2								0	
	3								0	
	4								0	
Necrosis, luteal cell, unilateral	1								0	
	2								0	
	3								1	
	4								0	

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Scheduled Sacrifice (Recovery)

Organ Findings	Sex	Male	Female		Scheduled Sacrifice (Recovery)
	Test Substance	CCH	CCH	CCH	
Dose	0	300	0	300	
Dose Unit	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	
Number of Animals	5	5	5	5	
	Grade	<0>	<1>		
Testis					
Atrophy, seminiferous tubular epithelium	1	0	1	0	
	2		1		
	3	0			
	4	0			

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Scheduled Sacrifice (Recovery)

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male CCH 0 mg/kg 5	Scheduled Sacrifice (Recovery)	
			Female CCH 0 mg/kg 5	Female CCH 300 mg/kg 5
Kidney	Grade	<5>	<5>	<0>
Basophilic tubule, proximal tubule	1	2	2	
	2	0	0	
	3	0	0	
	4	0	0	
Cell infiltration, inflammatory, pelvis	1	1	0	
	2	0	0	
	3	0	0	
	4	0	0	
Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	1	1	1	
	2	0	0	
	3	0	0	
	4	0	0	
Urinary bladder		<5>	<5>	<5>
Cell infiltration, lymphocyte, lamina propria	1	0	1	1
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
Hyperplasia, mucosal epithelium	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0

<5>, Number of animals examined

1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Table 39

Study No. B041794

Reproductive Performance (F0) - Summary
Mating Stage : 1st

Test Substance	Dose (mg/kg)	Mean S. D. n	Number of Pairs	Mean Estrus Cycle	Incidence of Females with Irregular Estrus Cycle	Mating Period		Copulation Index (%)	Fertility Index (%)
						Number of Estrus	Day of Conceiving		
CCH	0	Mean S. D. n	12	4.13 0.31	0/12	0.0 0.0	3.0 3.3	100.0	100.0
M	F			12		12	12	a) (12/12)	b) (12/12)
CCH	10	Mean S. D. n	12	4.08 0.29	0/12	0.1 0.3	3.7 4.2	100.0	100.0
M	F			12		12	12	(12/12)	(12/12)
CCH	60	Mean S. D. n	12	4.25 0.45	0/12	0.0 0.0	2.9 3.4	100.0	100.0
M	F			12		12	12	(12/12)	(12/12)
CCH	300	Mean S. D. n	12	4.00 0.00	0/12	0.0 0.0	2.8 1.3	100.0	100.0
M	F			12		12	12	(12/12)	(12/12)

a) : Number of copulated females / Number of pairs

b) : Number of pregnant females / Number of copulated females

Significantly different from control : *; P<0.05; **; P<0.01.

Table 40

Study No. B041794

Delivery Data (F0) - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)		Gestation (days)	Length	Number of Corpora Lutea	Number of Implantation Sites	Total Number of Offspring	Implantation Index (%)	Delivery Index (%)	Gestation Index (%)
CCH	0	Mean S. D. n	22.8 0.4 12	16.7 2.1 12	15.4 1.7 12	14.1 1.7 12	92.88 7.07 12	91.40 5.53 12	100.0 (12/12) a)
CCH	10	Mean S. D. n	22.6 0.5 11	15.9 2.1 12	13.9 3.3 12	12.8 4.8 12	86.63 12.93 12	88.97 28.21 12	91.7 (11/12)
CCH	60	Mean S. D. n	22.7 0.5 12	15.5 2.8 12	14.4 2.9 12	14.0 3.0 12	92.75 7.54 12	96.82 4.13 12	100.0 (12/12)
CCH	300	Mean S. D. n	22.6 0.5 12	15.8 1.6 12	15.2 1.5 12	14.3 1.2 12	95.88 4.06 12	94.23 6.02 12	100.0 (12/12)

a) Number of pregnant animals delivered live offspring / number of pregnant animals
 Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 41

Study No. B041794

Litter Size and Viability Index (F1) - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)		Total Number of Offspring at Birth			Number of Live Offspring at Birth			Number of Live Offspring on Day 4 before Culling			Number of Live Offspring on Day 4 after Culling			Number of Live Offspring on Day 5			Viability Index (%)		
		M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total	Day 0	Day 4	Day 5
CCH 0	Mean	6.8	7.3	14.1	6.5	7.3	13.8	6.3	7.3	13.6							98.20	98.33	
	S. D.	1.6	2.1	1.7	1.4	2.1	1.9	1.2	2.1	1.7							4.34	3.02	
	n (M/F)	12	12	12	12	12	12	12	12	12							12	12	
CCH 10	Mean	8.0	6.0	14.0	8.0	6.0	14.0	7.9	5.9	13.8							100.00	98.75	
	S. D.	2.9	1.9	2.7	2.9	1.9	2.7	2.9	2.0	2.7							0.00	2.79	
	n (M/F)	11	11	11	11	11	11	11	11	11							11	11	
CCH 60	Mean	6.3	7.8	14.0	6.0	7.5	13.5	5.5	7.0	12.5							97.06	91.11	
	S. D.	2.6	2.1	3.0	2.4	2.2	3.0	3.0	3.0	4.9							10.19	28.76	
	n (M/F)	12	12	12	12	12	12	12	12	12							12	12	
CCH 300	Mean	8.0	6.3	14.3	7.9	6.3	14.2	7.9	6.2	14.1							99.48	99.44	
	S. D.	1.5	1.7	1.2	1.4	1.7	1.1	1.4	1.7	1.1							1.79	1.93	
	n (M/F)	12	12	12	12	12	12	12	12	12							12	12	

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 42

Study No. B041794

Clinical Sign (F1 before Weaning) - Summary
Stage : Before Culling

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings (M/F)	Day	0	1	2	3	4
CCH 0	Number of dams		12	12	12	12	12
	Number of offspring	81/88/0	78/88	78/88	78/88	77/88	
	Number of dams with abnormal offspring	0	0	0	0	0	0
	No Abnormality	78/88	78/88	78/88	77/88	75/88	
	Death (M/F/U)	3/0/0	0/0	0/0	1/0	2/0	
CCH 10	Number of dams		11	11	11	11	11
	Number of offspring	88/66/0	88/66	88/65	88/65	87/65	
	Number of dams with abnormal offspring	0	0	0	0	0	0
	No Abnormality	88/66	88/65	88/65	87/65	87/65	
	Death (M/F/U)	0/0/0	0/1	0/0	1/0	0/0	
CCH 60	Number of dams		12	12	12	11	11
	Number of offspring	75/93/0	72/90	70/87	66/84	66/84	
	Number of dams with abnormal offspring	1	1	0	0	0	0
	No Abnormality	67/85	66/84	66/84	66/84	66/84	
	Death (M/F/U)	3/3/0	2/3	4/3	0/0	0/0	
CCH 300	Number of dams		12	12	12	12	12
	Number of offspring	96/75/0	95/75	95/75	95/75	95/75	
	Number of dams with abnormal offspring	0	0	0	0	0	0
	No Abnormality	95/75	95/75	95/75	95/75	95/74	
	Death (M/F/U)	1/0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	

M:Male, F:Female, U:Unable to be sexed on day 0

Table 43

Study No. B041794

Body Weight of Offspring (F1 before Weaning) - Summary
 Sex : Male

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	before Culling / after Culling	
		0	4
CCH 0	Mean S. D. n	7.3 0.6 12	11.9 1.3 12
CCH 10	Mean S. D. n	7.1 0.8 11	11.7 1.6 11
CCH 60	Mean S. D. n	7.1 0.7 12	11.8 1.8 11
CCH 300	Mean S. D. n	6.6 0.6 12	10.4 1.3 12

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 43

Study No. B041794

Body Weight of Offspring (F1 before Weaning) - Summary
Sex : Female

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/ Day	before Culling / after Culling		Unit : g
		0	4	
CCH 0	Mean S. D. n	7.0 0.5 12	11.4 1.2 12	
CCH 10	Mean S. D. n	6.6 0.8 11	11.0 1.7 11	
CCH 60	Mean S. D. n	6.7 0.7 12	11.3 1.7 11	
CCH 300	Mean S. D. n	6.2 0.7 12	10.0 1.2 12	

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 44

Study No. B041794

Body Weight Gain of Offspring (F1 before Weaning) - Summary
 Sex : Male Base : Day 4 after Birth

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	Substance /Day	before Culling		after Culling
		0	4	
CCH 0	Mean S. D. n	4.6 0.8 12		
CCH 10	Mean S. D. n	4.6 0.9 11		
CCH 60	Mean S. D. n	4.6 1.2 11		
CCH 300	Mean S. D. n	3.9 0.7 12		

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 44

Study No. B041794

Body Weight Gain of Offspring (F1 before Weaning) - Summary
 Sex : Female Base : Day 4 after Birth

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	Substance /Day	before Culling		after Culling
		0 - 4	12	
CCH 0	Mean S. D. n	4.4 0.8 12		
CCH 10	Mean S. D. n	4.3 1.0 11		
CCH 60	Mean S. D. n	4.4 1.2 11		
CCH 300	Mean S. D. n	3.8 0.7 12		

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 45

Study No. B041794

External Examination of Offspring (F1) - Summary
Day : 0 (Birth Day)

Test Substance	CCH	CCH	CCH	CCH
Dose (mg/kg)	0	10	60	300
Number of Dams	12	11	12	12
Number of Offspring	166	154	162	170
Number of Dams with Anomalous Offspring	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (8.3%)	0 (0.0%)
Number of Offspring with Any Anomalies	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)
Anal atresia	0 (0) Mean a) S. D. b)	0 (0) 0.0 0.0	1 (1) 0.6 2.2	0 (0) 0.0 0.0
Anuria	0 (0) Mean S. D.	0 (0) 0.0 0.0	1 (1) 0.6 2.2	0 (0) 0.0 0.0

a): Number of anomalous offspring / number of dams with anomalous offspring

b): Number of anomalous offspring / number of offspring examined x 100(%), on litter basis

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 46

Study No. B041794

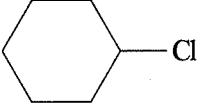
Necropsy Findings (F1 Offspring)
Test Substance : CCH

Test Substance Dose (mg/kg)	/Findings	Day:	Scheduled Sacrifice		Dead		Dead		Dead		Dead	
			4		M	F	M	F	M	F	M	F
CCH 0	Number of offspring examined		75	88		3					1	1
	No abnormality		75	88		3					1	1
CCH 10	Number of offspring examined		87	65								
	No abnormality		87	65							1	1
CCH 60	Number of offspring examined		66	84		3	2		2	2	4	3
	No abnormality		66	84		3	2		2	2	4	3
CCH 300	Number of offspring examined		95	74		1						
	No abnormality		95	74		1						

M:Male, F:Female

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	クロロシクロヘキサン		
別 名	—		
C A S 番号	542-18-7		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分 子 量	118.61		
試験に供した新規化学物質の純度 (%)	99.7%		
試験に供した新規化学物質のロット番号	5C1114		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸 気 壓	6.73 mmHg (25°C)		
対水溶解度	500 mg/L (25°C)		
1-オクタノール/水分配係数	3.36		
融 点	-44°C		
沸 点	142°C		
常温における性状	無色液体		
安 定 性	—		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	DMSO	50 mg/mL で溶解 ^{*1}	安定 ^{*2}
	水	50 mg/mL で不溶 ^{*1}	—
	アセトン	—	—
	生理食塩水	50 mg/mL で不溶 ^{*1}	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

*1：当研究所での溶媒検討の結果による。

*2：被験物質溶液調製時に、発熱、発泡、変色は認められなかった。

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
TA100	カリフォルニア大学 [REDACTED]	1983年5月27日
TA1535		
TA98		
TA1537		
WP2uvrA/pKMI01	日本バイオアッセイ研究センター	1997年9月18日

3. S9 mix

(1) S9 の入手方法等 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	I. 自製 <input checked="" type="radio"/> 2. 購入 (製造元 : キッコーマン株式会社)
製造年月日	2005年2月25日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-517
保存温度	-85°C ~ -80°C

(2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	SD系ラット	名称	フェバルビタル (PB), 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間	PB; 1日目: 0.03
体重	210~249g	及び投与量 (g/kg 体重)	2~4日目: 0.06 BF; PB 投与 3日目: 0.08

(3) S9 mix の組成

成分	S9 mix 1mL 中の量	成分	S9 mix 1mL 中の量
S9	0.1 mL	β-NADPH	4 μmol
MgCl ₂	8 μmol	β-NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
D-グルコース 6-リン酸	5 μmol	滅菌精製水	残量

4. 被験物質溶液の調製（被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。）

使用溶媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グレード	純度(%)
	DMSO	関東化学株式会社	508F1409	分光分析用	100
溶媒選択の理由	溶媒検討の結果、被験物質は 50 mg/mL で注射用水に不溶、DMSO に溶解した。また、DMSO を加えた際に発熱、発泡、変色は認められなかった。この結果から、溶媒には DMSO を用いた。				
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法					
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	15 分～25 分			室温	
純度換算の有無	有	無			

5. 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントプロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Oxoid Nutrient Broth No.2	Oxoid 社	261002
前培養時間	8 時間		
培養容器 (形状・容量)	L型試験管 22 mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	20 μL

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌 株 名	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
生菌数 (×10 ⁹ /mL)	予備試験	2.51	1.98	6.24	3.77
	本試験 1	2.51	1.96	6.11	3.54
	本試験 2	2.49	1.98	6.11	3.43
測 定 方 法 (いずれかを○で囲むこと)	1. O.D.値よりの換算			2. 段階希釀法	
	3. 濁度よりの換算				

6. 最少グルコース寒天平板培地（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

自製・購入の別	1. 自製 2. 購入（製造元：オリエンタル酵母工業株式会社）
製造年月日	2005年3月5日 製造
購入の場合のLot No.	クリメディア AM-N 培地 ANI190CU
使用寒天の名称・ 製造元・Lot No.	名 称：伊那寒天 (BA-30A) 製造元：伊那食品工業株式会社 Lot No. : 40721

7. 試験の方法（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

(1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	1. プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他（ ）
その他の場合は その選定理由	

(2) 試験条件

組 成	菌 懸 濁 液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液（直接法による場合）	0.5 mL
	S9 mix（代謝活性化法による場合）	0.5 mL
	トップアガー	2 mL
	その他（ ）	—
プレインキュベーション	温 度	37°C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37°C
	時 間	48 時間

8. コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル（目視）計測 2. 機器（自動コロニーカウンター）計測
補正の有無	1. 無 2. 有（補正の方法：面積および数え落とし補正）

9. 試験の結果

(1) 試験結果は別表 1~3 および図 1-1~2-2 による。

(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)	陽 性	陰 性
判定の理由 <p>予備試験の結果に基づいて、菌の生育阻害の認められる用量を最高用量として本試験を2回実施した結果、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の2倍未満であった。</p> <p>以上の結果から、被験物質は本試験条件下において変異原性を有さない（陰性）と結論した。</p>		

(3) 参考事項

- ・予備試験を 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/プレートの7用量で実施した結果、S9 mix 非存在下では TA100, TA1535 の 78.1 µg/プレート以上の用量、WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 の 313 µg/プレート以上の用量で、S9 mix 存在下ではすべての菌株の 313 µg/プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた。また、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の2倍未満であった。
- ・予備試験の結果から本試験は明らかな生育阻害を示す用量を最高用量として、S9 mix 非存在下の TA100, TA1535 は 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156 µg/プレートの 7 用量、WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313 µg/プレートの 6 用量で、S9 mix 存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313 µg/プレートの 6 用量、WP2uvrA/pKM101 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625 µg/プレートの 7 用量で実施した。
- ・S9 mix 非存在下および存在下のすべての菌株で菌の生育阻害が認められた。
- ・S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められなかつた。
- ・試験結果には統計学的検定を実施しなかつた。

別表 1

試験結果表（予備試験）

試験期間		2005年5月23日～2005年5月26日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	123	15	65	17	16
	1.22	118	16	69	26	21
	4.88	111	15	82	16	16
	19.5	100	19	64	24	22
	78.1	94 *	16 *	68	18	18
	313	0 *	0 *	59 *	20 *	8 *
	1250	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
S9 mix (+)	陰性対照	133	16	104	24	19
	1.22	117	10	104	24	25
	4.88	107	14	98	24	16
	19.5	112	16	92	31	25
	78.1	88	17	84	31	22
	313	90 *	7 *	77 *	24 *	12 *
	1250	0 *	0 *	56 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	623	560	640	837	389
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	959	212	600	423	154

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。
陰性対照: ジメチルスルホキシド(DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラゼン

別表2

試験結果表（本試験1）

試験期間		2005年6月7日～2005年6月10日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	103 91 (98) 100 (6)	9 12 (11) 13 (2)	94 86 (88) 85 (5)	22 16 (20) 22 (3)	11 13 (12) 13 (1)
	2.44	108 102 (101) 92 (8)	6 9 (8) 8 (2)			
	4.88	129 93 (103) 88 (22)	11 10 (11) 11 (1)			
	9.77	116 96 (102) 95 (12)	6 11 (8) 7 (3)	84 74 (85) 98 (12)	28 22 (26) 28 (3)	11 11 (12) 15 (2)
	19.5	92 95 (94) 94 (2)	8 9 (9) 9 (1)	117 106 (105) 93 (12)	17 24 (19) 16 (4)	12 8 (12) 17 (5)
	39.1	94 106 (101) 104 (6)	11 6 (8) 8 (3)	109 88 (94) 84 (13)	17 16 (19) 23 (4)	13 14 (13) 12 (1)
	78.1	108 * 96 * (105) 111 * (8)	13 * 10 * (10) 7 * (3)	102 87 (90) 81 (11)	22 22 (23) 24 (1)	16 13 (14) 13 (2)
	156	112 * 94 * (104) 107 * (9)	9 * 10 * (9) 8 * (1)	101 93 (88) 70 (16)	17 29 (24) 25 (6)	18 16 (17) 16 (1)
	313			59 * 79 * (63) 51 * (14)	17 * 15 * (18) 22 * (4)	9 * 10 * (11) 14 * (3)
S9 mix (+)	陰性対照	96 103 (104) 113 (9)	10 10 (11) 13 (2)	116 130 (116) 103 (14)	24 25 (26) 30 (3)	15 13 (13) 11 (2)
	9.77	81 115 (110) 133 (26)	13 8 (11) 11 (3)	108 117 (111) 108 (5)	25 18 (24) 29 (6)	13 14 (14) 15 (1)
	19.5	108 95 (104) 108 (8)	9 8 (8) 6 (2)	115 110 (111) 108 (4)	19 25 (24) 27 (4)	23 19 (18) 11 (6)
	39.1	103 120 (114) 120 (10)	7 7 (9) 14 (4)	100 100 (98) 93 (4)	26 26 (27) 30 (2)	19 22 (19) 17 (3)
	78.1	109 116 (108) 98 (9)	11 14 (11) 9 (3)	117 110 (111) 105 (6)	29 29 (27) 22 (4)	19 21 (17) 11 (5)
	156	119 * 112 * (109) 95 * (12)	8 * 11 * (10) 11 * (2)	93 109 (103) 108 (9)	28 24 (25) 24 (2)	19 15 (18) 19 (2)
	313	106 * 87 * (98) 100 * (10)	8 * 6 * (6) 3 * (3)	81 * 114 * (90) 76 * (21)	22 * 24 * (24) 27 * (3)	15 * 10 * (13) 15 * (3)
	625			49 * 50 * (56) 69 * (11)		
	陽性対照 S9 mix (-)	名前 用法(μg/プレート)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	AF-2 0.005	AF-2 0.1
		(コロニー数/プレート)	692 587 (641) 644 (53)	570 635 (612) 630 (36)	1226 1219 (1161) 1038 (107)	907 894 (929) 986 (50)
	陽性対照 S9 mix (+)	名前 用法(μg/プレート)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 2	2-AA 2
		(コロニー数/プレート)	1446 1280 (1350) 1324 (86)	230 193 (215) 222 (19)	880 674 (719) 604 (143)	441 461 (433) 396 (33)

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)
(±標準偏差)

陰性対照: ジメチルスルホキシド(DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

別表3

試験結果表（本試験2）

試験期間		2005年6月21日～2005年6月24日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	95 113 (104) 105 (9)	10 8 (9) 10 (1)	62 75 (71) 75 (8)	19 15 (16) 13 (3)	18 13 (13) 9 (5)
	2.44	103 97 (101) 102 (3)	10 10 (10) 10 (0)			
	4.88	112 102 (103) 94 (9)	14 11 (12) 10 (2)			
	9.77	110 104 (109) 114 (5)	8 9 (8) 8 (1)	88 59 (74) 76 (15)	18 23 (20) 19 (3)	16 9 (11) 8 (4)
	19.5	113 104 (108) 108 (5)	8 10 (11) 14 (3)	75 86 (78) 73 (7)	19 18 (17) 13 (3)	9 11 (11) 13 (2)
	39.1	110 117 (109) 99 (9)	14 9 (12) 14 (3)	67 78 (73) 74 (6)	19 18 (18) 16 (2)	10 12 (14) 19 (5)
	78.1	85 * 86 * (84) 82 * (2)	7 * 13 * (9) 6 * (4)	84 73 (79) 80 (6)	24 21 (20) 16 (4)	9 15 (12) 13 (3)
	156	85 * 88 * (87) 87 * (2)	7 * 7 * (8) 9 * (1)	80 61 (71) 72 (10)	15 18 (16) 15 (2)	10 11 (12) 15 (3)
	313			68 * 78 * (68) 59 * (10)	13 * 17 * (11) 3 * (7)	9 * 7 * (9) 10 * (2)
S9 mix (+)	陰性対照	101 111 (111) 121 (10)	13 14 (13) 11 (2)	83 110 (102) 114 (17)	25 18 (23) 25 (4)	19 17 (18) 17 (1)
	9.77	111 115 (114) 117 (3)	9 15 (12) 13 (3)	87 91 (93) 101 (7)	22 23 (26) 32 (6)	17 17 (15) 12 (3)
	19.5	123 111 (117) 118 (6)	9 9 (11) 16 (4)	99 89 (93) 92 (5)	24 24 (24) 23 (1)	17 16 (16) 15 (1)
	39.1	114 129 (115) 101 (14)	9 15 (12) 11 (3)	90 115 (96) 84 (16)	23 20 (25) 32 (6)	15 18 (17) 18 (2)
	78.1	129 126 (125) 121 (4)	11 15 (14) 15 (2)	93 84 (86) 82 (6)	18 25 (23) 26 (4)	19 19 (16) 11 (5)
	156	119 * 110 * (113) 110 * (5)	11 * 11 * (10) 9 * (1)	93 108 (101) 102 (8)	27 22 (24) 24 (3)	22 13 (17) 16 (5)
	313	86 * 91 * (87) 84 * (4)	7 * 13 * (9) 8 * (3)	99 * 97 * (95) 88 * (6)	24 * 24 * (24) 24 * (0)	11 * 15 * (15) 18 * (4)
	625			58 * 68 * (57) 44 * (12)		
	陽性対照 S9 mix (-)	名称 AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	688 672 (695) 726 (28)	554 597 (573) 568 (22)	1230 976 (1020) 853 (192)	984 805 (852) 767 (116)	328 310 (329) 350 (20)
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	1669 1290 (1452) 1398 (195)	200 248 (247) 293 (47)	876 714 (752) 667 (110)	379 372 (394) 430 (32)	188 189 (189) 190 (1)

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。 (平均値)
(±標準偏差)

陰性対照: ジメチルスルホキシド(DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラゼン

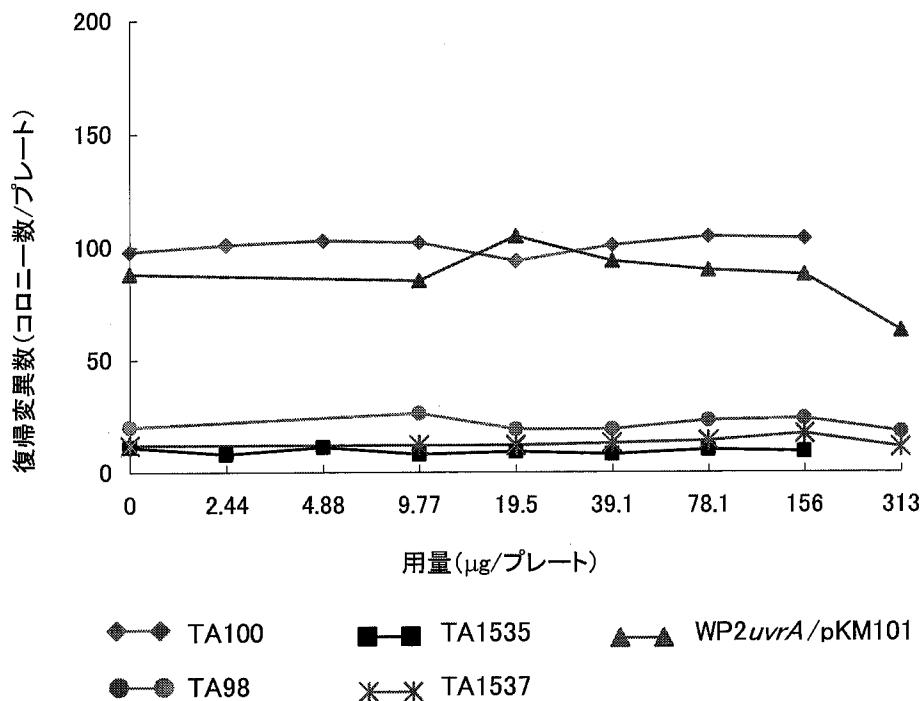


図 1-1 用量一反応曲線 (本試験 1; -S9 mix)

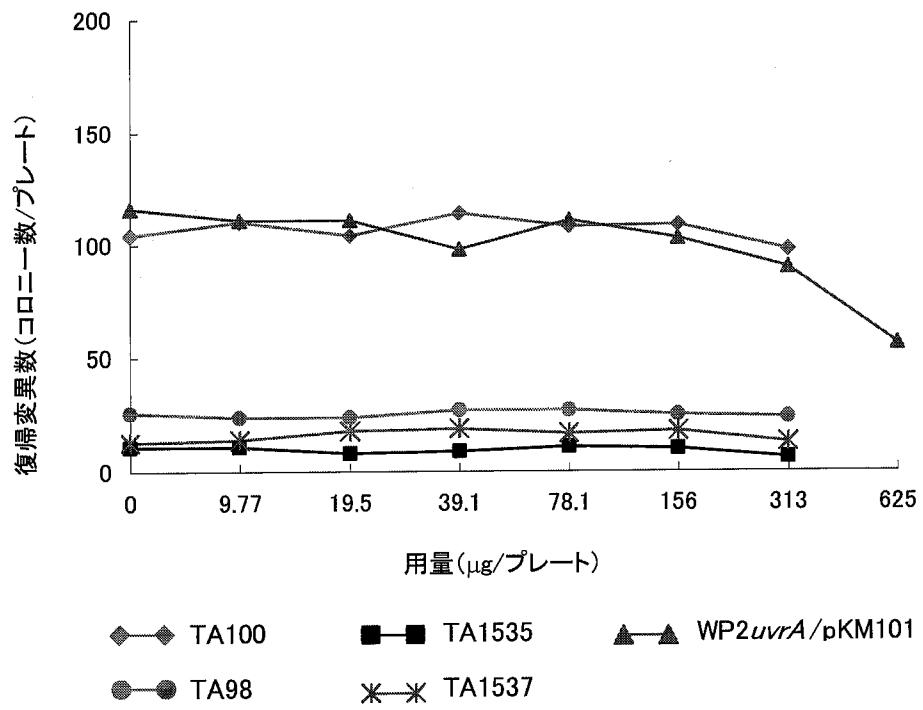


図 1-2 用量一反応曲線 (本試験 1; +S9 mix)

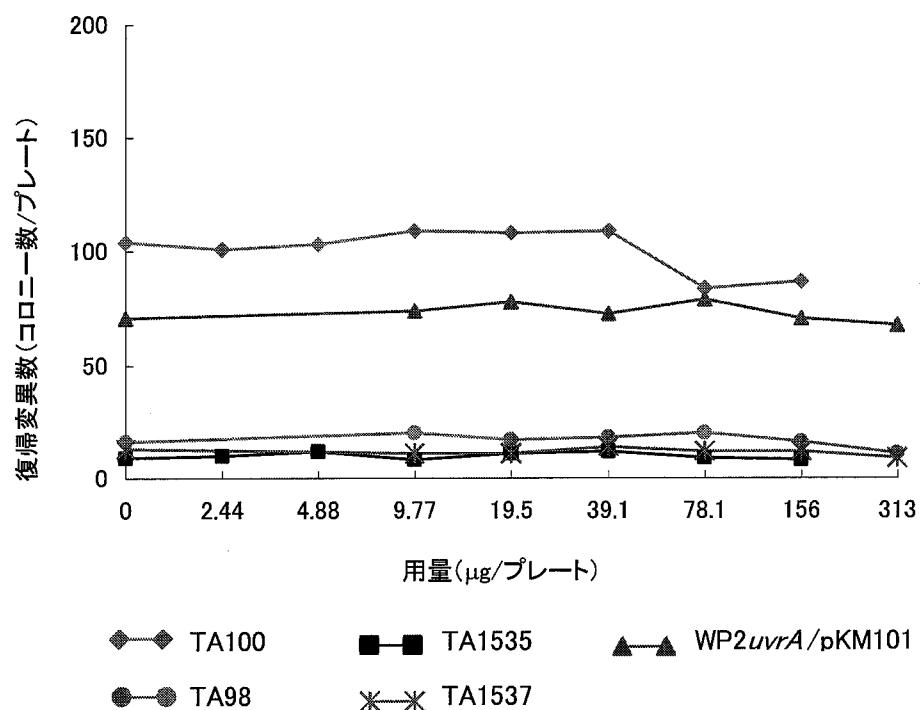


図 2-1 用量一反応曲線 (本試験 2; -S9 mix)

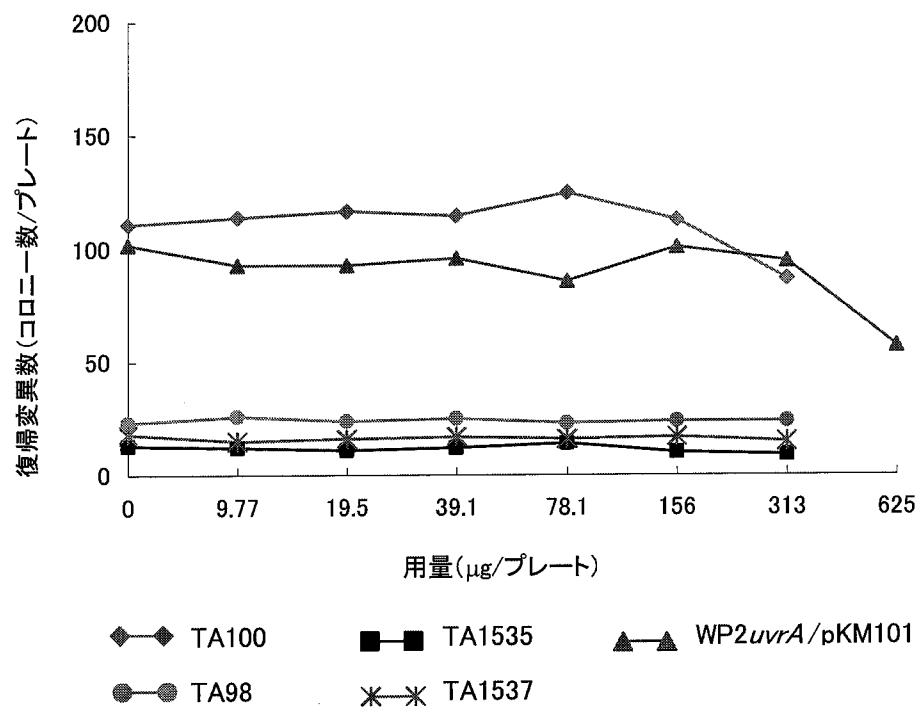


図 2-2 用量一反応曲線 (本試験 2; +S9 mix)

3. 試験実施概要

3.1 表題

クロロシクロヘキサンの細菌を用いる復帰突然変異試験

3.2 試験番号

B041795

3.3 試験目的

ネズミチフス菌株および大腸菌株を用いる復帰突然変異試験を実施し、クロロシクロヘキサンの変異原性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

(1) 新規化学物質等に係る試験の方法について

(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号 厚生労働省医薬食品局長、平成 15・11・13 製局第 2 号 経済産業省製造産業局長、環保企発第 031121002 号 環境省総合環境政策局長連名通知)

(2) OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No.471, 1997)

3.5 適用 GLP

(1) 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について

(厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 15 年 11 月 21 日)

(2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

3.6 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞ヶ関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県神栖市砂山 14 番地
(2005 年 7 月 31 日までは茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地)

5. 要約

ネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98 および TA1537 ならびに大腸菌株 WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験でクロロシクロヘキサンの変異原性を調べた。試験は S9 mix 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により実施した。

予備試験を 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/プレートの 7 用量で実施した結果、S9 mix 非存在下では TA100, TA1535 の 78.1 µg/プレート以上の用量、WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 の 313 µg/プレート以上の用量で、S9 mix 存在下ではすべての菌株の 313 µg/プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた。また、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった。

予備試験の結果から本試験は、S9 mix 非存在下の TA100, TA1535 は 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156 µg/プレートの 7 用量、WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313 µg/プレートの 6 用量で、S9 mix 存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313 µg/プレートの 6 用量、WP2uvrA/pKM101 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625 µg/プレートの 7 用量で実施した。

2 回の本試験の結果、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった。また、S9 mix 非存在下では TA100, TA1535 の 78.1 µg/プレート以上の用量、WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 の 313 µg/プレートの用量で、S9 mix 存在下では TA100, TA1535 の 156 µg/プレート以上の用量、WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 の 313 µg/プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた。なお、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

当該試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値は、当研究所の適正範囲内であった。また、陽性対照により誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍を超えて増加し、明らかな陽性結果を示した。従って、本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から、クロロシクロヘキサンは本試験条件下において変異原性を有さないと結論した。

表1 試験結果表（予備試験）

試験期間		2005年5月23日～2005年5月26日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	123	15	65	17	16
	1.22	118	16	69	26	21
	4.88	111	15	82	16	16
	19.5	100	19	64	24	22
	78.1	94 *	16 *	68	18	18
	313	0 *	0 *	59 *	20 *	8 *
	1250	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
S9 mix (+)	陰性対照	133	16	104	24	19
	1.22	117	10	104	24	25
	4.88	107	14	98	24	16
	19.5	112	16	92	31	25
	78.1	88	17	84	31	22
	313	90 *	7 *	77 *	24 *	12 *
	1250	0 *	0 *	56 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	623	560	640	837	389
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	959	212	600	423	154

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。
陰性対照:ジメチルスルホキシド(DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラゼン

表2 試験結果表（本試験1）

試験期間		2005年6月7日～2005年6月10日									
代謝活性化系の有無	被験物質用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)									
		塩基対置換型			フレームシフト型						
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537					
S9 mix (-)	陰性対照	103 91 100	(98) (6)	9 12 13	(11) (2)	94 86 85	(88) (5)	22 16 22	(20) (3)	11 13 13	(12) (1)
	2.44	108 102 92	(101) (8)	6 9 8	(8) (2)						
	4.88	129 93 88	(103) (22)	11 10 11	(11) (1)						
	9.77	116 96 95	(102) (12)	6 11 7	(8) (3)	84 74 98	(85) (12)	28 22 28	(26) (3)	11 11 15	(12) (2)
	19.5	92 95 94	(94) (2)	8 9 9	(9) (1)	117 106 93	(105) (12)	17 24 16	(19) (4)	12 8 17	(12) (5)
	39.1	94 106 104	(101) (6)	11 6 8	(8) (3)	109 88 84	(94) (13)	17 16 23	(19) (4)	13 14 12	(13) (1)
	78.1	108 * 96 * 111 *	(105) (8)	13 * 10 * 7 *	(10) (3)	102 87 81	(90) (11)	22 22 24	(23) (1)	16 13 13	(14) (2)
	156	112 * 94 * 107 *	(104) (9)	9 * 10 * 8 *	(9) (1)	101 93 70	(88) (16)	17 29 25	(24) (6)	18 16 16	(17) (1)
	313					59 * 79 * 51 *	(63) (14)	17 * 15 * 22 *	(18) (4)	9 * 10 * 14 *	(11) (3)
	96 103 113	(104) (9)		10 10 13	(11) (2)	116 130 103	(116) (116)	24 25 30	(26) (3)	15 13 11	(13) (2)
	81 115 133	(110) (26)		13 8 11	(11) (3)	108 117 108	(111) (111)	25 18 29	(24) (6)	13 14 15	(14) (1)
	19.5	108 95 108	(104) (8)	9 8 6	(8) (2)	115 110 108	(111) (111)	19 25 27	(24) (4)	23 19 11	(18) (6)
	39.1	103 120 120	(114) (10)	7 7 14	(9) (4)	100 100 93	(98) (4)	26 26 30	(27) (2)	19 22 17	(19) (3)
	78.1	109 116 98	(108) (9)	11 14 9	(11) (3)	117 110 105	(111) (111)	29 29 22	(27) (4)	19 21 11	(17) (5)
	156	119 * 112 * 95 *	(109) (12)	8 * 11 * 11 *	(10) (2)	93 109 108	(9)	28 24 24	(25) (2)	19 15 19	(18) (2)
	313	106 * 87 * 100 *	(98) (10)	8 * 6 * 3 *	(6) (3)	81 * 114 * 76 *	(90) (21)	22 * 24 * 27 *	(24) (3)	15 * 10 * 15 *	(13) (3)
	625					49 * 50 * 69 *	(56) (11)				
陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA					
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80					
	(コロニー数/プレート)	692 587 644	(641) (53)	570 635 630	(612) (36)	1226 1219 1038	(1161) (107)	907 894 986	(929) (50)	444 381 452	(426) (39)
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA					
	用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2					
	(コロニー数/プレート)	1446 1280 1324	(1350) (86)	230 193 222	(215) (19)	880 674 604	(719) (143)	441 461 396	(433) (33)	205 226 175	(202) (26)

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)
(±標準偏差)

陰性対照: ジメチルスルホキシド(DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表3 試験結果表（本試験2）

試験期間		2005年6月21日～2005年6月24日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	95 113 (104) 105 (9)	10 8 (9) 10 (1)	62 75 (71) 75 (8)	19 15 (16) 13 (3)	18 13 (13) 9 (5)
	2.44	103 97 (101) 102 (3)	10 10 (10) 10 (0)			
	4.88	112 102 (103) 94 (9)	14 11 (12) 10 (2)			
	9.77	110 104 (109) 114 (5)	8 9 (8) 8 (1)	88 59 (74) 76 (15)	18 23 (20) 19 (3)	16 9 (11) 8 (4)
	19.5	113 104 (108) 108 (5)	8 10 (11) 14 (3)	75 86 (78) 73 (7)	19 18 (17) 13 (3)	9 11 (11) 13 (2)
	39.1	110 117 (109) 99 (9)	14 9 (12) 14 (3)	67 78 (73) 74 (6)	19 18 (18) 16 (2)	10 12 (14) 19 (5)
	78.1	85 * 86 * (84) 82 * (2)	7 * 13 * (9) 6 * (4)	84 73 (79) 80 (6)	24 21 (20) 16 (4)	9 15 (12) 13 (3)
	156	85 * 88 * (87) 87 * (2)	7 * 7 * (8) 9 * (1)	80 61 (71) 72 (10)	15 18 (16) 15 (2)	10 11 (12) 15 (3)
	313			68 * 78 * (68) 59 * (10)	13 * 17 * (11) 3 * (7)	9 * 7 * (9) 10 * (2)
	S9 mix (+)	陰性対照	101 111 (111) 121 (10)	13 14 (13) 11 (2)	83 110 (102) 114 (17)	25 18 (23) 25 (4)
		9.77	111 115 (114) 117 (3)	9 15 (12) 13 (3)	87 91 (93) 101 (7)	22 23 (26) 32 (6)
		19.5	123 111 (117) 118 (6)	9 9 (11) 16 (4)	99 89 (93) 92 (5)	24 24 (24) 23 (1)
		39.1	114 129 (115) 101 (14)	9 15 (12) 11 (3)	90 115 (96) 84 (16)	23 20 (25) 32 (6)
		78.1	129 126 (125) 121 (4)	11 15 (14) 15 (2)	93 84 (86) 82 (6)	18 25 (23) 26 (4)
		156	119 * 110 * (113) 110 * (5)	11 * 11 * (10) 9 * (1)	93 108 (101) 102 (8)	27 22 (24) 24 (3)
		313	86 * 91 * (87) 84 * (4)	7 * 13 * (9) 8 * (3)	99 * 97 * (95) 88 * (6)	24 * 24 * (24) 24 * (0)
		625			58 * 68 * (57) 44 * (12)	
		名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
		用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1
陽性対照 S9 mix (-)		(コロニー数/プレート)	688 672 (695) 726 (28)	554 597 (573) 568 (22)	1230 976 (1020) 853 (192)	984 805 (852) 767 (116)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
陽性対照 S9 mix (+)		用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5
		(コロニー数/プレート)	1669 1290 (1452) 1398 (195)	200 248 (247) 293 (47)	876 714 (752) 667 (110)	379 372 (394) 430 (32)

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)
(±標準偏差)

陰性対照: ジメチルスルホキシド(DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

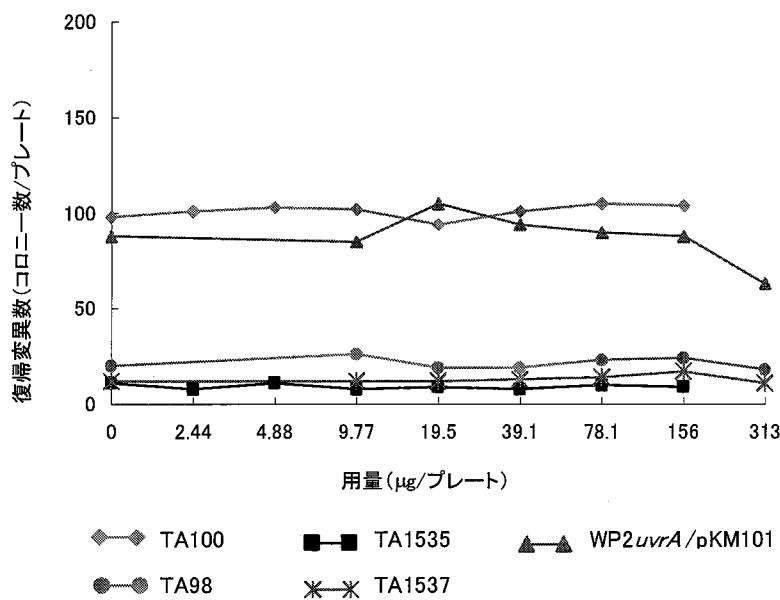


図 1-1 用量一反応曲線 (本試験 1; -S9 mix)

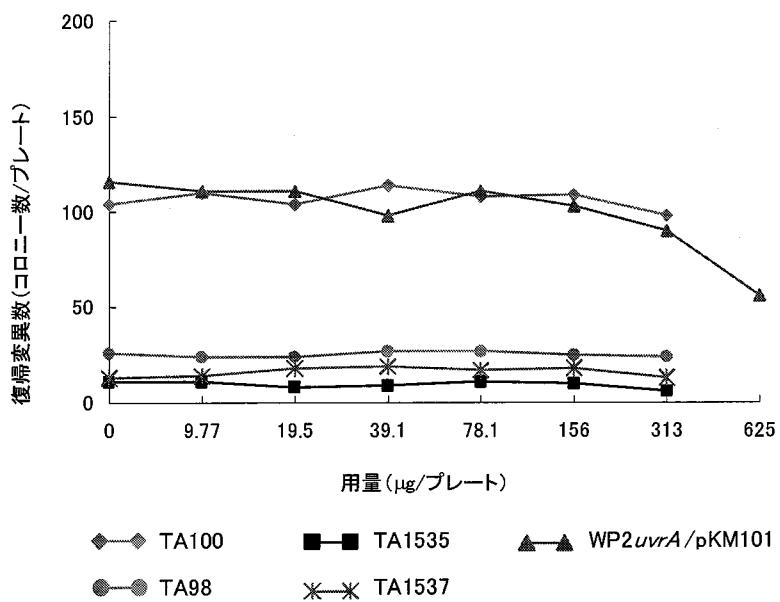


図 1-2 用量一反応曲線 (本試験 1; +S9 mix)

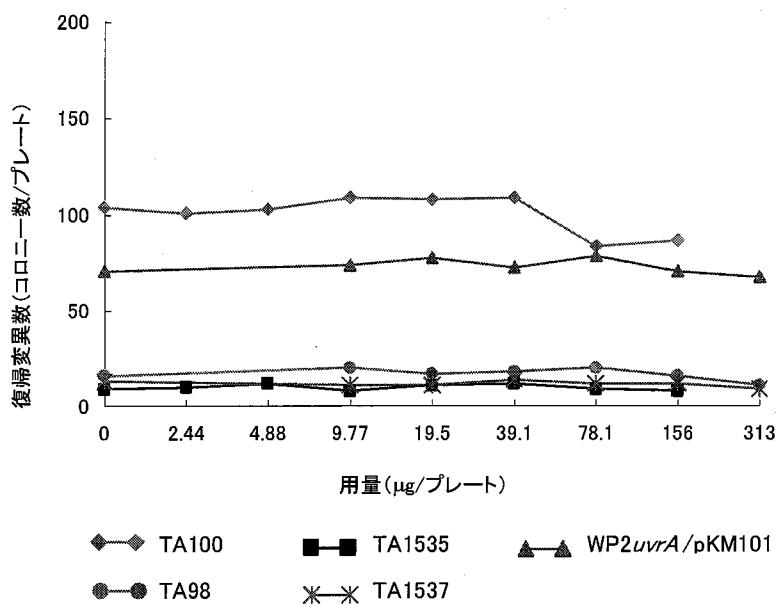


図 2-1 用量一反応曲線 (本試験 2; -S9 mix)

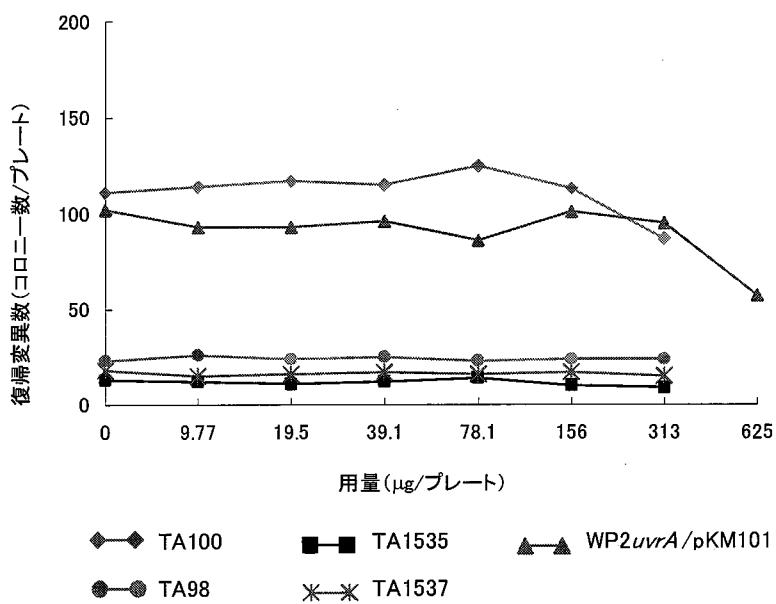


図 2-2 用量一反応曲線 (本試験 2; +S9 mix)

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	クロロシクロヘキサン		
別 名	—		
CAS 番号	542-18-7		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、 その製法の概要)			
分子量	118.61		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	99.7%		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	5C1114		
不純物の名称 及び含有率	—		
蒸 気 圧	6.73 mmHg (25°C)		
対水溶解度	500 mg/L (25°C)		
1-オクタノール/水分配係数	3.36		
融 点	-44°C		
沸 点	142°C		
常温における性状	無色液体		
安 定 性	—		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	50 mg/mL で不溶 ^{*1}	—
	DMSO	500 mg/mL で溶解 ^{*1}	安定 ^{*2}
	生理食塩液	50 mg/mL で不溶 ^{*1}	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

*1 : 試験施設で実施した溶媒検討の結果による。

*2 : 溶液の調製時に発熱, 発泡, 変色は認められなかった。

2. 細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	大日本製薬株式会社	
種	チャニーズ ハムスター	入手年月日	2003年9月2日	
培養液	イーグルMEM	製造元	日本製薬株式会社	
血清の種類と添加量	牛 10%	製造元 (Lot No.)	Invitrogen Corp. (444175)	
細胞周期	14.6 h	凍結条件	液体窒素中	
継代数	21～23*	培養条件	容器	
染色体数 (モード)	25本		温度	37 °C
			CO ₂ 濃度	5%
備考	*: 細胞入手時継代数: 14, 凍結細胞継代数: 17			

3. S9 mix

(1) S9 の入手方法等

自製・購入の別	1. 自製 <input checked="" type="radio"/> 2. 購入 (製造元 : キッコーマン株式会社)
製造年月日	2005年1月14日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-515
保存温度	-80°C以下 (実測値; -84～-82°C)

(2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	フェノバルビタール (PB), 5,6-ベンゾフラン (BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週令	7週	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	PB; 4日間 0.03–0.06 BF; 1日間 0.08
体重	206–239 g		

(3) S9 mix の組成

成分	S9 mix 1 mL 中の量	成分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.3 mL	β -NADP ⁺	4 μmol
MgCl ₂	5 μmol	NADPH	— μmol
KCl	33 μmol	HEPES 緩衝液 (pH7.2)	4 μmol
D-グルコース 6-リン酸	5 μmol	精製水	残量

(4) S9 mix の処理条件

1. プレート法	2. 細胞浮遊法	3. その他 ()
S9 量 (最終濃度)		5%
S9 蛋白量 (最終濃度)		1.37 mg/mL
処理時間		6 h
回復時間		18 h
備考		

4. 被験物質溶液の調製

	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
使用溶媒	ジメチルスルホキシド	関東化学 株式会社	510F1666	分光 分析用	100.0
溶媒選択の理由	溶媒検討の結果、本被験物質は生理食塩液に 50 mg/mL で溶解しなかつたが、ジメチルスルホキシド（以下 DMSO）には 500 mg/mL で溶解し、溶液に発熱、発泡、変色は認められなかった。従って、本被験物質の溶媒（陰性対照物質）には DMSO を用いた。				
被験物質溶液 の性状	溶解	懸濁	その他 ()		
被験物質が難溶性 の場合における 懸濁等の方法	—				
溶液の調製から 使用までの 保存時間と温度	10 分～30 分 10 分～25 分 10 分	室温 室温 室温	: 細胞増殖抑制試験 : 染色体異常試験（短時間処理法） : 染色体異常試験（連続処理法）		
純度換算の有無	有	無			

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2005年5月20日から 2005年5月24日	2005年5月20日から 2005年5月24日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	3.0 mL／培養器	2.5 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／mL	4×10^3 個／mL
	前培養日数*	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.03 mL／培養器	0.03 mL／培養器
	S9 mix 添加量		0.5 mL／培養器
	S9 の 最 終 濃 度		5%
	S9 蛋白の最終濃度		1.37 mg/mL
	処理時間	6 h	6 h
	回復時間	18 h	18 h
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤で細胞を計数した。		
備考	* : 培養開始日を 0 日とした。		

(2) 細胞増殖抑制試験の結果

代謝活性化法によらない場合 (6-18 h)		代謝活性化法による場合 (6-18 h)	
用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)	用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100	0 (溶媒)	100
125	93	100	88
250	34	200	87
500	9	300	57
750	4	400	61
1000	2	500	2
1500	0	750	12
2000	0	1000	0

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2005年5月27日から 2005年6月8日	2005年5月27日から 2005年6月8日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径6cm	直径6cm
	培 養 液 量	3.0mL／培養器	2.5mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2枚	2枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／mL	4×10^3 個／mL
	前培養日数*	3日間	3日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.03mL／培養器	0.03mL／培養器
	S9 mix 添加量		0.5mL／培養器
	S9の最終濃度		5%
	S9蛋白の最終濃度		1.37mg/mL
	処理時間	6h	6h
	回復時間	18h	18h
備考	*: 培養開始日を0日とした。		

(4) 染色体異常試験の結果（別表1, 2による。）

6. 連続処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		(24-0 h) 処理による場合
試験実施期間		2005年5月20日から 2005年5月24日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm
	培 養 液 量	5.0 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／mL
	前培養日数*	3日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.05 mL／培養器
	処理時間	24 h
	回復時間	0 h
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤で細胞を計数した。	
備考	* : 培養開始日を 0 日とした。	

(2) 細胞増殖抑制試験の結果

(24-0 h) 処理による場合	
用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100
50	97
100	101
200	63
300	0*
400	0
500	0

* : IC50 値は「0.4」として算出した.

(3) 染色体異常試験の条件

		(24-0 h) 処理による場合
試験実施期間		2005年6月17日から 2005年6月28日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm
	培 養 液 量	5.0 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／mL
	前培養日数*	3日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.05 mL／培養器
	処理時間	24 h
	回復時間	0 h
備考	*：培養開始日を0日とした。	

(4) 染色体異常試験の結果（別表1, 3による。）

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定	陽 性	陰 性
判定の理由		

染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件のいずれの被験物質用量においても5%未満であった。

(2) 参考事項

- 細胞増殖抑制試験に先立ち、予備試験を実施した。短時間処理法S9 mix非共存下（以下-S9 mix）およびS9 mix共存下（以下+S9 mix）ならびに連続処理法24時間処理（以下24時間処理）について、50, 500, 5000 µg/mLを設定し、1用量あたり1枚のプレートを用いて実施した。処理終了後のプレートを位相差倒立顕微鏡で観察し、陰性対照群プレートの細胞密度を100%として相対的な細胞密度を判断した。

その結果、各プレートの細胞密度は以下の通りであった。

処理条件	用量 (µg/mL)	50	500	5000
-S9 mix	100%	50%	10%	
+S9 mix	100%	30%	20%	
24時間処理	100%	5%	0%	

この結果に基づき、細胞増殖抑制試験の用量は下記を設定した。

-S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/mL

+S9 mix : 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 µg/mL

24時間処理 : 50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL

- 細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制用量(IC₅₀)は、-S9 mixで202 µg/mL、+S9 mixで406 µg/mL、24時間処理で205 µg/mLであった。

IC₅₀を参考に、染色体異常試験は下記の用量を設定した。

-S9 mix : 100, 150, 200, 250, 300, 350 µg/mL

+S9 mix : 200, 300, 400, 450, 500 µg/mL

24時間処理 : 150, 175, 200, 225, 250, 275 µg/mL

- 染色体異常試験の予備鏡検の結果、+S9 mixの500 µg/mLでは、いずれのプレートにおいても50個以上の分裂中期細胞が得られなかつたため、これらのプレートから作製した標本は観察の対象から除外した。

- 構造異常は、以下の分類¹に従って観察した。

染色分体型切断

染色分体型交換

染色体型切断

染色体型交換 (二動原体、環状染色体など)

断片化

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。他の異常と区別して記録し、構造異常には含めなかった。

- ・数的異常は、動原体数が 35 以上の倍数体細胞（核内倍加細胞を含む）とした。
- ・染色体異常細胞は、下記の定義で集計した。
 - 構造異常細胞：染色体構造異常を 1 個以上持つ細胞
 - 数的異常細胞：染色体数的異常を持つ細胞
- ・被験物質の染色体異常誘発性の判定基準は下記の通りとした。
 - 陰性：いずれの被験物質処理群においても、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が 5%未満である。
 - 疑陽性：いずれかの被験物質処理群において、構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が 5%以上 10%未満である。
 - 陽性：いずれかの被験物質処理群において、構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が 10%以上であり、用量依存的な増加傾向が認められる。
- ・統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。
- ・標本観察の結果、陰性対照群における染色体構造異常および数的異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件においても 5%未満であった。一方、陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件においても 10%以上であった。これらによって当試験は技術的に成立していることが示された。
- ・染色体異常試験において、1 枚のプレートあたり 500 個、すなわち各用量あたり 1000 個の細胞について、分裂中期細胞を数え、下式により分裂指数（%）を算出した。

$$\text{分裂指数（%）} = \frac{\text{分裂中期細胞数}}{\text{観察細胞数}} \times 100$$
 またこれをもとに、各処理用量について、陰性対照値を 100%として下式により相対分裂指数（%）を算出した。

$$\text{相対分裂指数（%）} = \frac{\text{被験物質処理群の分裂指数}}{\text{陰性対照群の分裂指数}} \times 100$$
- ・分裂指数測定の結果、細胞増殖率を指標とした場合に比べて顕著な分裂抑制が認められなかっことから、被験物質の細胞周期に対する著しい影響は無いものと考えられた（別表 1）。
- ・陽性対照物質に関する情報は以下の通りである。
 - マイトイシン C（協和発酵工業株式会社、ロット番号 435ADB、含量 99%）
 - ベンゾ[a]ピレン（東京化成工業株式会社、ロット番号 GG01、含量 95.6%）
- ・参考文献
 1. 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会・第 3 分科会・遺伝毒性ワーキンググループ編「医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A」サイエンティスト社、東京、2000
 2. 祖父尼俊雄監修「染色体異常試験データ集・改訂 1998 年版」株式会社エル・アイ・シー、東京、1999

別表1 分裂指数測定結果

処理	処理-回復時間 (h)	S9 mix の有無	処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察細胞数	分裂中期細胞数	分裂指数 (%)	相対分裂指数 (%)
陰性対照 (DMSO)	6-18	—	0	1000	71	7.1	100
クロロシクロヘキサン	6-18	—	100	1000	60	6.0	85
	6-18	—	150	1000	69	6.9	97
	6-18	—	200	1000	51	5.1	72
	6-18	—	250	1000	48	4.8	68
	6-18	—	300	1000	56	5.6	79
	6-18	—	350	1000	39	3.9	55
陰性対照 (DMSO)	6-18	+	0	1000	115	11.5	100
クロロシクロヘキサン	6-18	+	200	1000	95	9.5	83
	6-18	+	300	1000	76	7.6	66
	6-18	+	400	1000	53	5.3	46
	6-18	+	450	1000	29	2.9	25
	6-18	+	500	1000	5	0.5	4
陰性対照 (DMSO)	24-0	—	0	1000	46	4.6	100
クロロシクロヘキサン	24-0	—	150	1000	49	4.9	107
	24-0	—	175	1000	45	4.5	98
	24-0	—	200	1000	51	5.1	111
	24-0	—	225	1000	48	4.8	104
	24-0	—	250	1000	41	4.1	89
	24-0	—	275	1000	16	1.6	35

DMSO : ジメチルスルホキシド

別表 2 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称 クロソシクロヘキサン

処理-回復 時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)						ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数の異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 - 18	-	陰性対照 (DMSO)	100	0	1	0	0	0	1	0	99	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	101	100	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	100	100	1	0	0	0	0	1	0	91	100	1	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	89	100	1	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	90	200	2 (1.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	150	100	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	87	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	200	100	0	1	1	0	0	2	0	83	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	78	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	250	100	0	0	0	0	0	0	0	56	100	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	58	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	57	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	300	100	0	0	0	0	0	0	0	64	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	56	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	60	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	350	100	0	1	0	0	0	1	0	26	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	15	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	34	33	3	0	0	0	53	0	100	0	0
			100	42	31	1	0	0	0	53	0	100	0	0
			200	76 (38.0)	64 (32.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	106 (53.0)	0	3	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	108	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	92	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	200	100	0	0	0	0	0	0	0	79	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	82	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	81	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	300	100	1	0	1	0	0	2	1	46	100	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	55	100	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	1	50	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	400	100	1	0	1	0	0	2	0	40	100	1	1
			100	0	0	1	0	0	1	0	36	100	1	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	38	200	2 (1.0)	1 (0.5)
6 - 18	+	450	100	0	1	0	0	0	1	0	33	100	0	0
			66	1	1	0	0	0	2	0	6	66	0	0
			166	1 (0.6)	2 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.8)	0	20	166	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	500	Tox						3			Tox		
			100	42	49	3	2	0	66	0	4			
			100	34	53	0	1	0	62	0	4			
6 - 18	+	陽性対照 (BP20)	100	76 (38.0)	102 (51.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	128 (64.0)	0	3	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	4	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	4	200	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC, BP : ベンゾ [a] ピレン

Tox : 細胞毒性のため、プレートあたり50個以上の分裂中期細胞が得られなかった。

別表 3 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称 クロロシクロヘキサン

処理・回復時間(h)	被験物質の用量(µg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数の異常細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24 - 0	陰性対照(DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	103	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	97	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	150	100	0	0	0	0	0	0	0	70	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	71	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	71	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	175	100	0	0	0	0	0	0	0	70	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	66	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	68	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	200	100	1	0	1	0	0	2	0	65	100	1	1	2
		100	0	0	0	0	0	0	0	62	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	64	200	2 (1.0)	1 (0.5)	3 (1.5)
24 - 0	225	100	0	0	0	0	0	0	0	53	100	2	0	2
		100	1	0	0	0	0	1	0	53	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	53	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
24 - 0	250	100	1	1	0	0	0	1	0	41	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	37	100	1	0	1
		200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	39	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24 - 0	275	100	0	1	0	1	0	2	0	18	100	1	0	1
		100	1	3	2	0	0	6	0	13	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	4 (2.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	8 (4.0)	0	15	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
24 - 0	陽性対照(MMC 0.05)	100	25	19	1	0	0	36	0	100	0	0	0	0
		100	30	24	0	0	0	50	0	100	0	0	0	0
		200	55 (27.5)	43 (21.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	86 (43.0)	0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC

1643

B041796

図1 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性
(短時間処理法・-S9 mix)

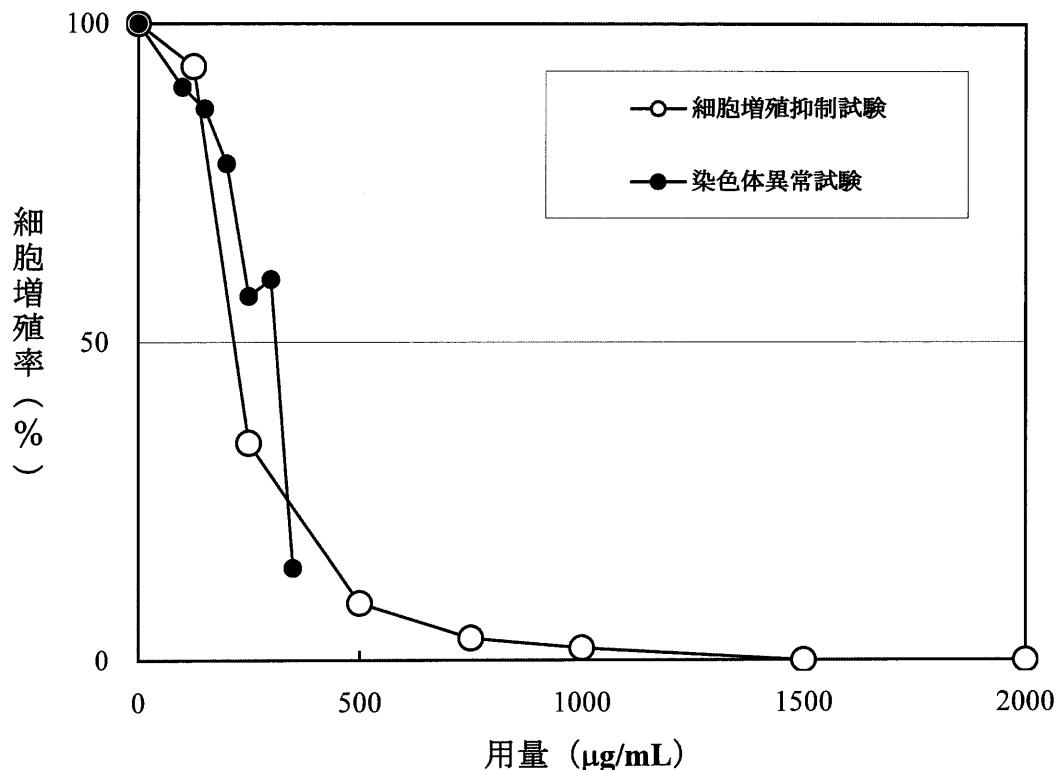


図2 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性
(短時間処理法・+S9 mix)

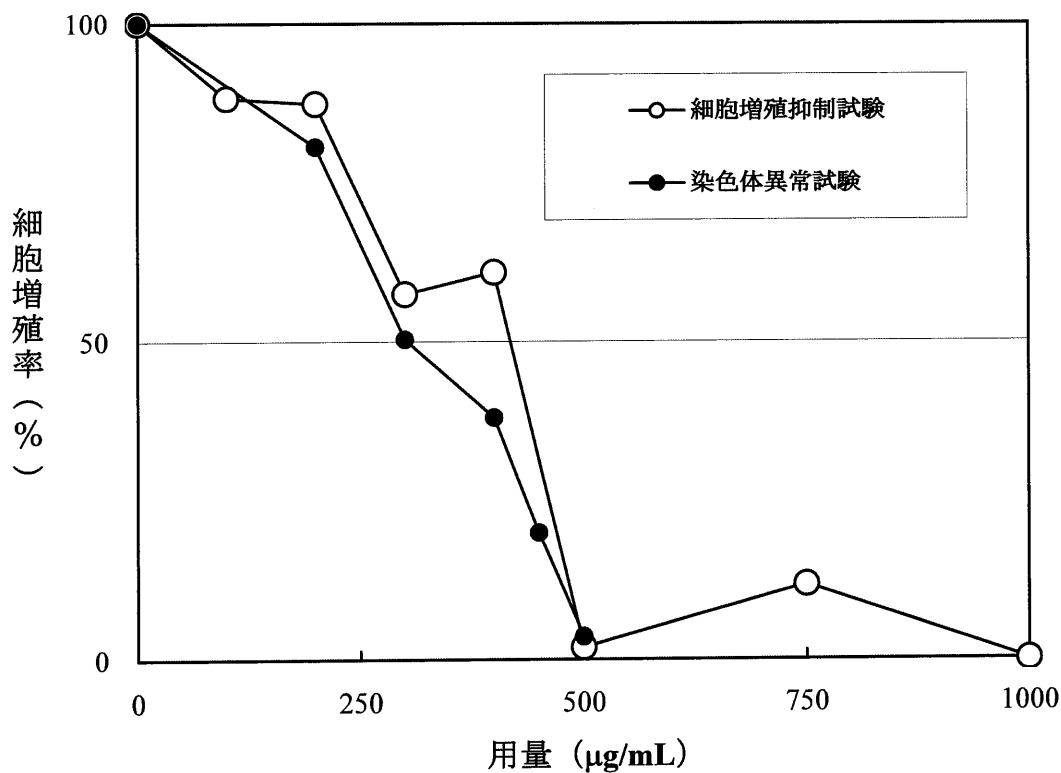


図3 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性
(連続処理法)

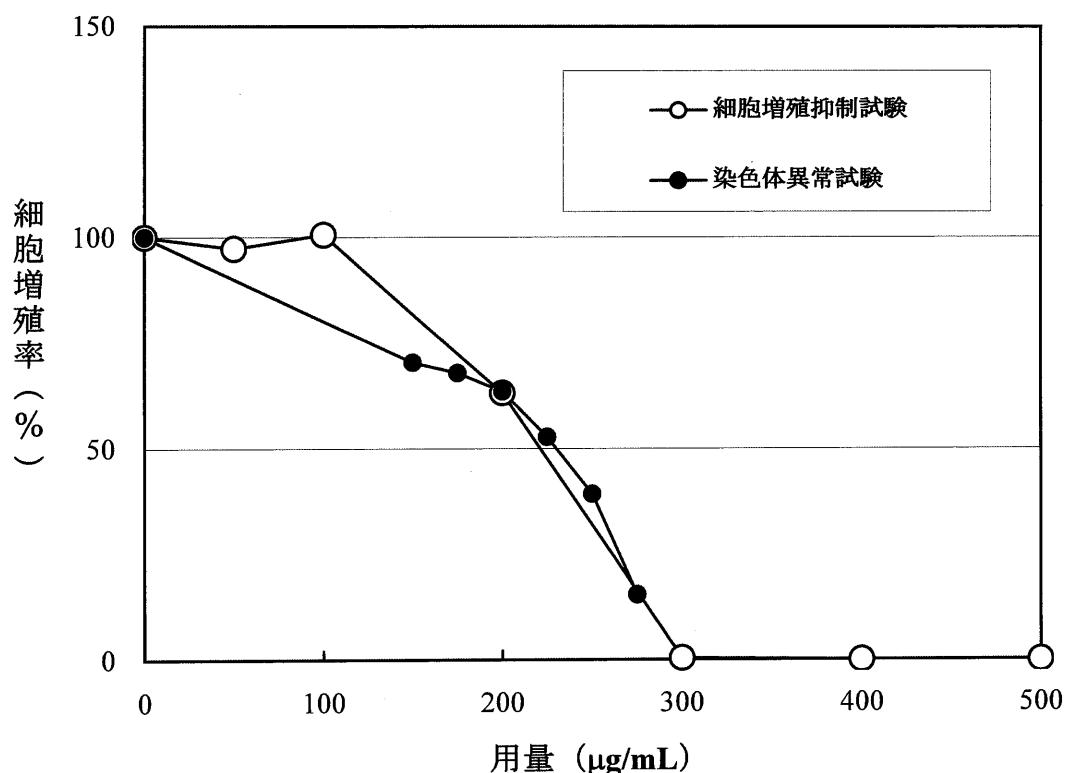


図4 クロロシクロヘキサン処理における構造異常細胞出現頻度

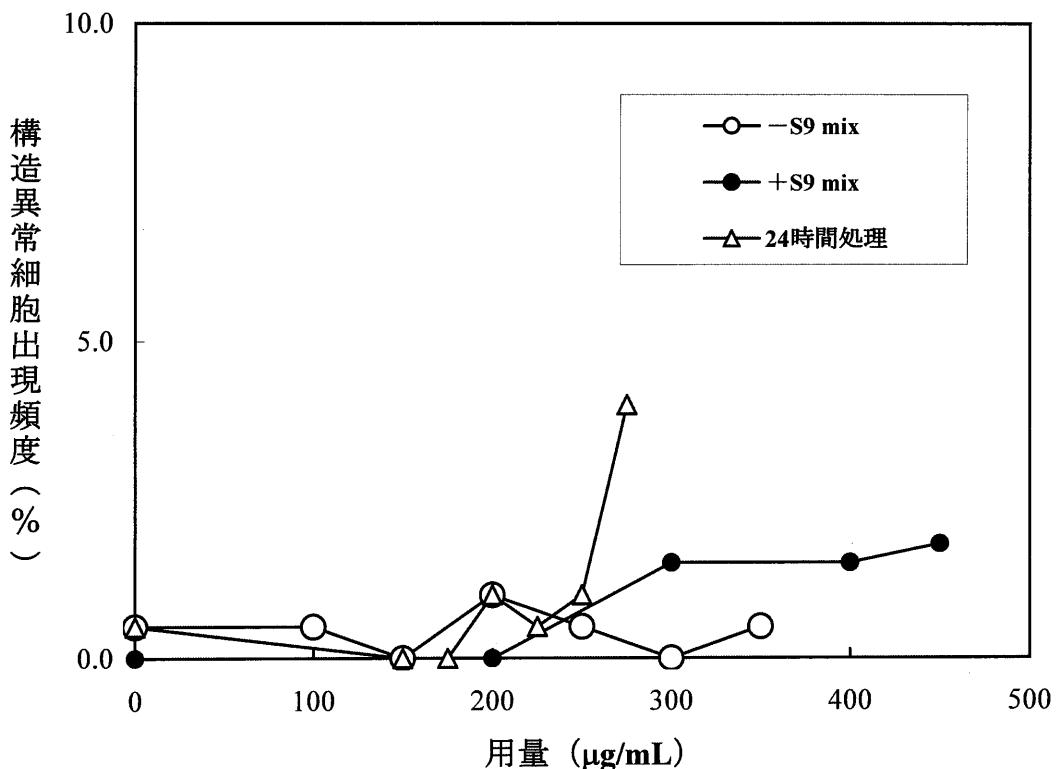
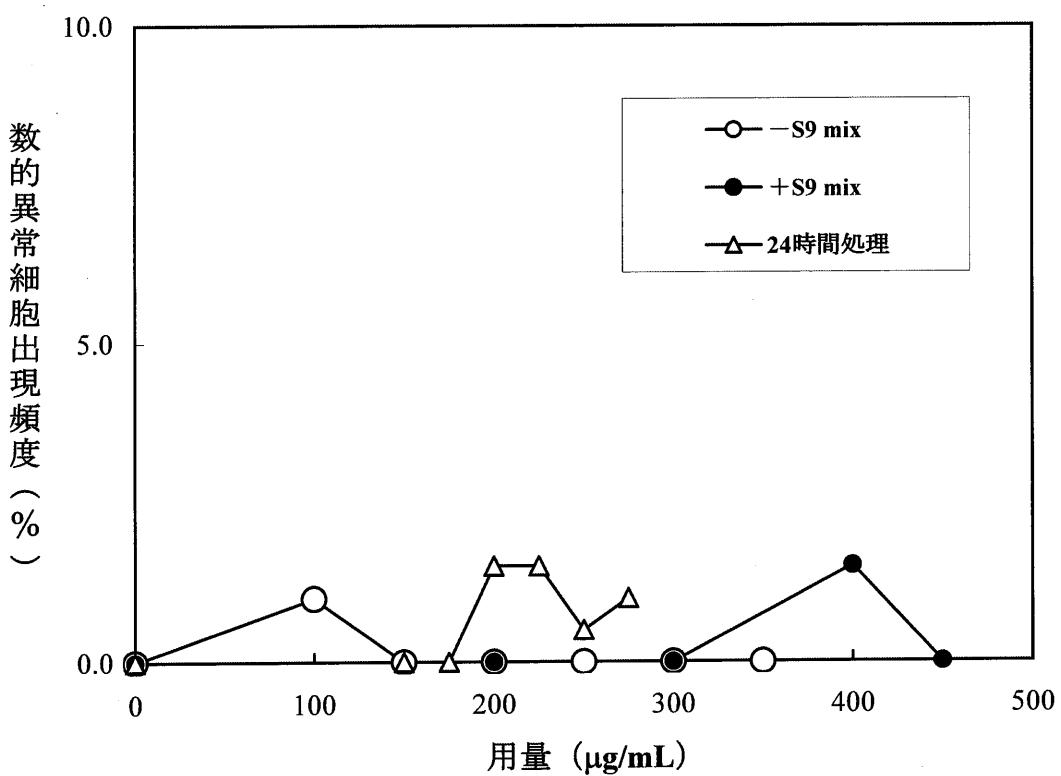


図5 クロロシクロヘキサン処理における数的異常細胞出現頻度



3. 試験実施概要

3.1 表題

クロロシクロヘキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3.2 試験番号

B041796

3.3 試験目的

クロロシクロヘキサンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

(1) 新規化学物質等に係る試験の方法について

(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号 厚生労働省医薬食品局長、平成 15・11・13 製局第 2 号 経済産業省製造産業局長、環保企発第 031121002 号 環境省総合環境政策局長連名通知)

(2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (No. 473, 1997)

3.5 適用 GLP

(1) 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について

(厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 15 年 11 月 21 日)

(2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

3.6 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞ヶ関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県神栖市砂山 14 番地

5. 要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、クロロシクロヘキサンの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

予備試験の結果に基づき、細胞増殖抑制試験は、短時間処理法 S9 mix 非共存下(以下-S9 mix) および S9 mix 共存下(以下+S9 mix)、連続処理法 24 時間処理(以下 24 時間処理)で各々下記の用量を設定した。

-S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/mL

+S9 mix : 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 µg/mL

24 時間処理 : 50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL

この結果、50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は-S9 mix で 202 µg/mL, +S9 mix で 406 µg/mL, 24 時間処理で 205 µg/mL であった。

算出した IC_{50} に基づき、染色体異常試験は下記の用量を設定した。

-S9 mix : 100, 150, 200, 250, 300, 350 µg/mL

+S9 mix : 200, 300, 400, 450, 500 µg/mL

24 時間処理 : 150, 175, 200, 225, 250, 275 µg/mL

標本観察の結果、いずれの処理条件のいずれの被験物質用量においても、染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった。

従って、クロロシクロヘキサンは、当試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有さないものと結論した。

表1 細胞増殖抑制試験の結果

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)		
	短時間処理法		連続処理法 24時間処理
	-S9 mix	+S9 mix	
陰性対照 (DMSO)	100	100	100
50			97
100		88	101
125	93		
200		87	63
250	34		
300		57	0*
400		61	0
500	9	2	0
750	4	12	
1000	2	0	
1500	0		
2000	0		

DMSO : ジメチルスルホキシド

*: IC50値は「0.4」として算出した。

表2 分裂指数測定結果

処理	処理-回復時間(h)	S9 mixの有無	処理濃度(µg/mL)	観察細胞数	分裂中期細胞数	分裂指数(%)	相対分裂指数(%)
陰性対照(DMSO)	6-18	-	0	1000	71	7.1	100
クロロシクロヘキサン	6-18	-	100	1000	60	6.0	85
	6-18	-	150	1000	69	6.9	97
	6-18	-	200	1000	51	5.1	72
	6-18	-	250	1000	48	4.8	68
	6-18	-	300	1000	56	5.6	79
	6-18	-	350	1000	39	3.9	55
陰性対照(DMSO)	6-18	+	0	1000	115	11.5	100
クロロシクロヘキサン	6-18	+	200	1000	95	9.5	83
	6-18	+	300	1000	76	7.6	66
	6-18	+	400	1000	53	5.3	46
	6-18	+	450	1000	29	2.9	25
	6-18	+	500	1000	5	0.5	4
陰性対照(DMSO)	24-0	-	0	1000	46	4.6	100
クロロシクロヘキサン	24-0	-	150	1000	49	4.9	107
	24-0	-	175	1000	45	4.5	98
	24-0	-	200	1000	51	5.1	111
	24-0	-	225	1000	48	4.8	104
	24-0	-	250	1000	41	4.1	89
	24-0	-	275	1000	16	1.6	35

DMSO : ジメチルスルホキシド

被験物質の名称 クロロシクロヘキサン

表 3 染色体異常試験の結果(短時間処理法)

処理・回復 時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 (μg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)						ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数の異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	0	1	0	0	0	1	0	99	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	101	100	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	100	100	1	0	0	0	0	1	0	91	100	1	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	89	100	1	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	90	200	2 (1.0)	0 (0.0)
6-18	-	150	100	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	87	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	200	100	0	1	1	0	0	2	0	83	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	78	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	250	100	0	0	0	0	0	0	0	56	100	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	58	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	57	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	300	100	0	0	0	0	0	0	0	64	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	56	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	60	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	350	100	0	1	0	0	0	1	0	26	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	15	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	34	33	3	0	0	53	0	100	0	0	0
			100	42	31	1	0	0	53	0	100	0	0	0
			200	76 (38.0)	64 (32.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	106 (53.0)	0	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	108	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	92	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	200	100	0	0	0	0	0	0	0	79	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	82	100	0	0
			100	1	0	1	0	0	2	1	45	100	0	0
6-18	+	300	100	0	0	1	0	0	1	0	55	100	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	1	50	200	0 (0.0)	0 (0.0)
			100	1	0	1	0	0	2	0	40	100	1	2
6-18	+	400	100	0	0	1	0	0	1	0	36	100	1	1
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	38	200	2 (1.0)	1 (0.5)
			100	0	1	0	0	0	1	0	33	100	0	0
6-18	+	450	66	1	1	0	0	0	2	0	6	66	0	0
			166	1 (0.6)	2 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.8)	0	20	166	0 (0.0)	0 (0.0)
										3				
6-18	+	500								4				Tox
										4				Tox
											100	0	0	0
6-18	+	陽性対照 (BP20)	100	42	49	3	2	0	66	0	100	0	0	0
			100	34	53	0	1	0	62	0	100	0	0	0
			200	76 (38.0)	102 (51.0)	3 (15)	3 (1.5)	0 (0.0)	128 (64.0)	0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO : デメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC, BP : ベンゾ [a] ピレン

Tox : 細胞毒性のため、プレートあたり50個以上の分裂中期細胞が得られなかった。

表 4 染色体異常試験の結果(連続処理法)

被験物質の名称 クロシンクロヘキサン

処理回復時間(h)	被験物質の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)						ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)				
		観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)	
24 - 0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	103	100	0	0	0	
		100	1	0	0	0	0	0	97	100	0	0	0	
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	150	100	0	0	0	0	0	0	70	100	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	71	100	0	0	0	
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	71	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	175	100	0	0	0	0	0	0	70	100	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	66	100	0	0	0	
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	68	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	200	100	1	0	1	0	0	2	65	100	1	1	2	
		100	0	0	0	0	0	0	62	100	1	0	1	
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	64	200	2 (1.0)	1 (0.5)	3 (1.5)
24 - 0	225	100	0	0	0	0	0	0	53	100	2	0	2	
		100	1	0	0	0	0	1	0	53	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	53	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
24 - 0	250	100	1	1	0	0	0	1	0	41	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	37	100	1	0	1
		200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	39	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24 - 0	275	100	0	1	0	1	0	2	0	18	100	1	0	1
		100	1	3	2	0	0	6	0	13	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	4 (2.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	8 (4.0)	0	15	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
24 - 0	陽性対照 (MMC 0.05)	100	25	19	1	0	0	36	0	100	0	0	0	
		100	30	24	0	0	0	50	0	100	0	0	0	
		200	55 (27.5)	43 (21.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	86 (43.0)	0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC

図1 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性
(短時間処理法・-S9 mix)

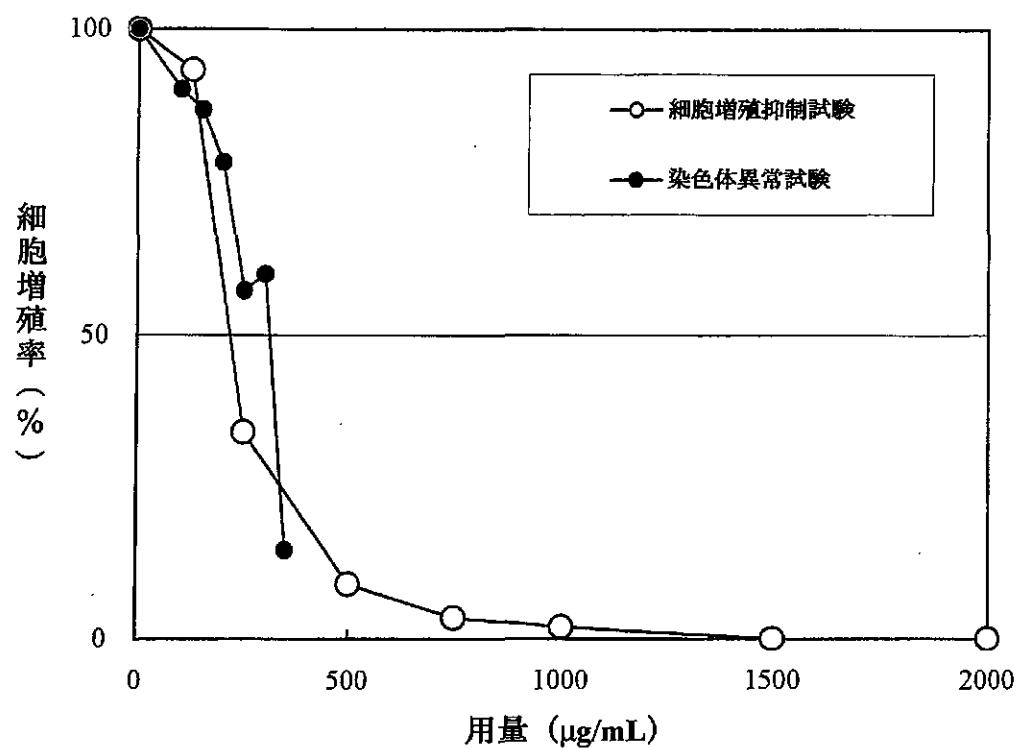
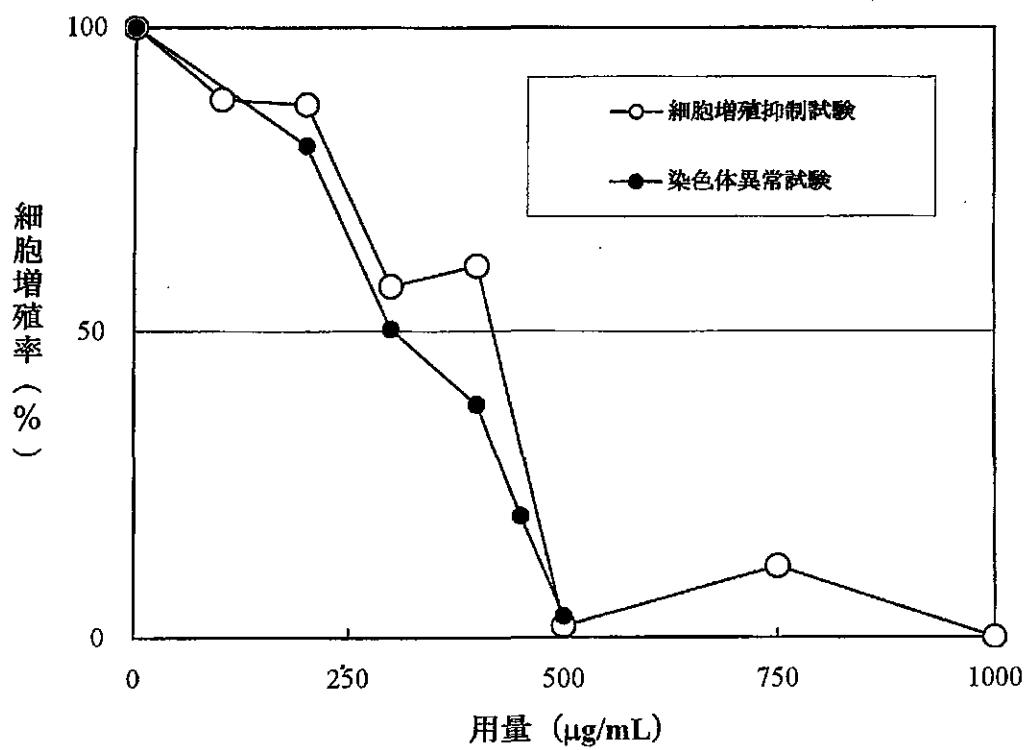


図2 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性
(短時間処理法・+S9 mix)



3. 試験実施概要

3.1 表題

1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのラットを用いた経口投与による急性毒性試験

3.2 試験番号

B041797

3.3 試験目的

1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンをラットに経口投与し、その急性毒性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

OECD ガイドライン No. 423, December 17, 2001

3.5 適用 GLP

OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」

（厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 15 年 11 月 21 日）

3.6 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県神栖市砂山 14 番地

3.9 試験責任者

株式会社三菱化学安全科学研究所

5. 要約

1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンを OECD テストガイドライン (TG) 423 に従って 8~9 週齢の SD 系雌ラット (Crl:CD(SD)) に強制経口投与し、その急性経口毒性を検討した。投与用量は第 1 回および 2 回投与を 300 mg/kg, 第 3 回投与を 2000 mg/kg とした。1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンを精製水で溶解調製し、投与前日の夕方から絶食したラットに 10 mL/kg の液量で投与した。

第 3 回投与群の 2000 mg/kg で、自発運動低下、眼瞼下垂、体温低下、呼吸不整、緩徐呼吸、姿勢の異常（腹臥位、背臥位、うずくまり）がみられ投与第 2 日までに全例が死亡した。剖検の結果、前胃および腺胃の赤色化ならびに水腫、胃および腸管に異常内容物の貯留が認められた。第 1 回および 2 回投与群の 300 mg/kg では死亡例はなく、一般状態、体重および剖検のいずれも被験物質に起因する変化は認められなかった。

本試験条件下における 1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンの Globally Harmonized Classification System (GHS) は Category 4 (>300-2000 mg/kg b.w.) に分類された。

6. 緒言

1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンの毒性情報としては、ラット LD₅₀ 値が 700 mg/kg で、強い刺激性を有することが報告[1]されている。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、OECD TG423 に従いラットの急性毒性試験を行ったので報告する。

ンピュータシステムのプロトコール番号は第1回投与用に B041797_(_は空白), その後の投与段階には第2回投与を B041797A, 第3回投与を B041797Bとした.

8. 結果, 考察および結論

8.1 一般状態 (Table 1, Appendix 1)

第1回および第2回投与群の 300 mg/kg では死亡はなく, 一般状態にも変化は認められなかった.

第3回投与群の 2000 mg/kg では投与日（第1日）に1例, 第2日に2例が死亡した. 一般状態の変化として, 投与後10分より自発運動低下および呼吸不整が全例, 30分ではこれに加え眼瞼下垂, 腹臥位あるいは背臥位が全例に認められた. 投与後1および3時間では中等度の自発運動低下, 眼瞼下垂, 緩徐呼吸およびうずくまりが全例で認められた. 投与後6時間では1例（動物番号 70102）が死亡し, 残り2例は体温低下を示し翌日に死亡した.

8.2 体重および体重増加量 (Tables 2 and 3, Appendix 2 and 3)

第1回および2回投与群の 300 mg/kg では, 体重は順調に増加した.

8.3 剖検 (Table 4, Appendix 4)

第1回および2回投与群の 300 mg/kg では異常は認められなかった.

死亡動物の剖検では, 前胃および腺胃の赤色化, 水腫, 異常内容物貯留, 腸管に異常内容物貯留が全例に認められた. また, 投与日に死亡した1例は赤色の腹水が認められた.

8.4 考察および結論

1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンを 300 および 2000 mg/kg の用量で雌ラットに単回経口投与し, その急性毒性変化を検討した.

第3回投与群の 2000 mg/kg で, 自発運動低下, 眼瞼下垂, 体温低下, 呼吸および姿勢の異常がみられ投与第2日までに全例が死亡し, 剖検では胃および腸管に異常所見が認められた. 胃・腸管の変化は被験物質が有する刺激性に起因するものと考えられる [1]. 第1回および2回投与群の 300 mg/kg では死亡例はなく, 一般状態, 体重および剖検のいずれも被験物質に起因する変化は認められなかった.

本試験条件下における 1, 3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンの GHS は Category 4 (>300-2000 mg/kg b.w.) に分類された.

Table 1 Clinical Sign - Summary

Test Substance Dose	Findings	Day Time	Female														
			10	20	30	40	50	60	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1, 3-BAC 300 mg/kg (First)	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No Abnormality		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
1, 3-BAC 300 mg/kg (Second)	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No Abnormality		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
1, 3-BAC 2000 mg/kg (Third)	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	3	2							
	No Abnormality		3	0	0	0	0	0	0	1	2						
	Death	+	0	0	0	0	0	0	1	2							
	Prone position	+	0	0	2	0	0	0	0	0							
	Supine position	+	0	0	1	0	0	0	0	0							
	Crouching position	+	0	0	0	3	3	2	0								
	Decrease in locomotor activity	1	0	3	0	0	0	0	0	0							
		2	0	0	3	3	3	0	0	0							
		3	0	0	0	0	0	0	2	0							
	Irregular respiration	+	0	3	3	0	0	0	0	0							
	Bradypnea	+	0	0	0	3	3	2	0								
	Hypothermia	+	0	0	0	0	0	0	2	0							
	Ptosis	1	0	0	3	3	3	2	0								

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

Time 10, Before dosing; Time 20, 10 min. after dosing; Time 30, 30 min. after dosing; Time 40, 1 hr. after dosing; Time 50, 3 hr. after dosing;
Time 60, 6 hr. after dosing;

Table 2 Body Weight - Summary

Female

Unit : g

Test Substance Dose	Day	1	4	8	15	
1, 3-BAC 300 mg/kg (First)	Mean	191.0	215.3	223.0	241.7	
	S. D.	1.0	0.6	5.6	7.0	
	n	3	3	3	3	
1, 3-BAC 300 mg/kg (Second)	Mean	196.7	221.7	236.3	244.7	
	S. D.	2.1	7.5	12.5	18.8	
	n	3	3	3	3	
1, 3-BAC 2000 mg/kg (Third)	Mean	180.7				
	S. D.	1.5				
	n	3				

Table 3 Body Weight Gain - Summary

Test Substance Dose	Day	Female			Unit : g
		1-4	4-8	8-15	
1, 3-BAC 300 mg/kg (First)	Mean	24.3	7.7	18.7	
	S. D.	1.2	5.0	5.1	
	n	3	3	3	
1, 3-BAC 300 mg/kg (Second)	Mean	25.0	14.7	8.3	
	S. D.	6.2	5.0	6.7	
	n	3	3	3	

Study No. B041797

Table 4 Necropsy Findings - Summary

Scheduled Sacrifice (Day 15)

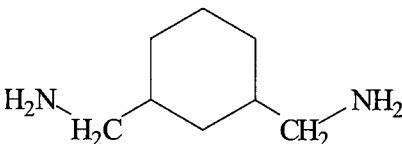
Organ Findings	Sex	:	Female	
	Test Substance	:	1, 3-BAC (First)	1, 3-BAC (Second)
	Dose (mg/kg)	:	300	300
	Number of Animals	:	3	3
	Number of Animals Examined	:	<3>	<3>
No abnormality			3	3

Table 4 Necropsy Findings - Summary

		Death
Organ Findings	Sex	: Female
	Test Substance	: 1, 3-BAC (Third)
	Dose (mg/kg)	: 2000
	Number of Animals	: 3
	Number of Animals Examined	: <3>
 Stomach		
	Abnormal contents, tar	3
Edema		
	Reddish change, (forestomach, glandular stomach)	3
 Duodenum		
	Abnormal contents, tar	3
 Jejunum		
	Abnormal contents, tar	3
 Ileum		
	Abnormal contents, tar	3
 Abdominal cavity		
	Ascites	1

ほ乳類を用いた既存化学物質毒性試験結果報告書

1. 一般的事項

既存化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン			
別名	—	物理化学性状	分子量	142.24
構造式又は示性式 (又はその製法の概要)			常温における性状	無色透明液体
			安定性	—
			融点	-70°C以下
			沸点	244°C
			蒸気圧	1,866Pa, 14 mmHg(120°C)
			分配係数	—
			対水溶解度	可溶
			溶水	50 mg/mLで溶解 ^{*1}
			DMSO	50 mg/mLで溶解 ^{*1}
Lot No.50303	(C ₈ H ₁₈ N ₂)		アセトン	—
試験に供した化学物質の純度	99.98%		生食	50 mg/mLで溶解 ^{*1}
不純物の名称および濃度	—		その他	—
CAS番号	2579-20-6			

1) DMSO: デメチルソルボキド, 生食: 生理食塩液 *1: 試験施設で実施した溶媒検討の結果による.

2. 急性毒性試験および投与量設定試験

試験No.	試験の種類及び期間	動物種	1群当たりの動物数	投与経路	投与量(mg/kg/day)	LD50値又はNOEL*(mg/kg)	実験場所
1	急性毒性試験	ラット	雌 3匹 ^{a)}	経口	300 300 2000	第1回投与: 3匹中死亡なし 第2回投与: 3匹中死亡なし 第3回投与: 3匹全例死亡 Category 4 (>300-2000 mg/kg b.w.) に分類された.	(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所
2	投与量設定試験 (14日間反復)	ラット	雄 3匹/群 雌 3匹/群	経口	1000 300 100 30 0	雌雄とも第2日までの間に死亡 ^{b)} した. 雌雄で前胃粘膜の水腫, 雄で網赤血球数およびALAT (GPT) 活性の高値, 雌で流涎および腎臓重量の低値が認められた. 被験物質に起因する変化は認められなかった. NOEL 被験物質に起因する変化は認められなかった. 変化なし.	(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所

*NOEL : No-Observed-Effect Level

a) 第1回～3回のいずれも雌3匹に投与した.

b) 濕死期解剖動物を含む.

3. 経口投与反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

被験物質	1,3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン CAS No. : 2579-20-6					
被験物質投与期間	雄：平成 17年8月30日～平成17年10月10日 [計42日間] 雌：平成 17年8月30日～平成17年10月22日					
使用動物種・系統 投与経路	ラット, Cr:CD(SD) 強制経口投与	1群の動物数；雌雄各12匹（雌は対照群および 300 mg/kg群に回復動物として各5匹を追加）			被験物質純度 99.98%	

1) 反復投与毒性

用量 (mg/kg/day) 検査項目 [性] [動物数] ^{c)}	対照群				10	60	300	対照群	300	
	投与終了後				回復終了後 ^{d)}					
	♂/♀ [7/12]	♂/♀ [12/12]	♂/♀ [12/12]	♂/♀ [7/12]	♂/♀ [5/5]	♂/♀ [5/5]	(↑↓ : 傾向, △▽ : P<0.05, ▲▼ : P<0.01, - : 変化なし, *: 検査せず)			
一般状態										
死亡 ^{d)}	+/-	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0				
流涎	+	0/0	0/0	11/14	0/0	0/0				
呼吸不整		0/0	0/0	1/0	0/0	0/0				
ラッセル音		0/0	0/0	1/1	0/0	0/0				
被毛状態の異常		0/0	0/0	1/0	0/0	0/0				
眼瞼下垂		0/0	0/0	1/0	0/0	0/0				
自発運動の低下	+	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0				
歯の欠損		0/1	0/0	0/0	0/0	0/0				
児なめの欠如 ^{e)}		0/0	0/0	0/1	0/0	0/0				
回集行動の欠如 ^{e)}		0/0	0/0	0/1	0/0	0/0				
行動検査										
詳細な症状観察		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-			
機能検査		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-			
自発運動量		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-			
体重		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-			
体重 (体重増加量)		-/-	-/-	-/-	▼ ^{f)} / -	-/-	-/-			
摂餌量		-/-	-/-	-/-	-/△ ^{g)}	-/-	-/-			
血液学検査										
血小板数		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	△/-			
網赤血球数		-/-	-/-	-/-	▲/-	-/-	-/-			
白血球数		-/-	-/-	-/-	↑/-	-/-	-/-			
白血球百分率好中球比		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	▽/-			
血液生化学検査										
グルコース		-/-	▲/-	-/-	-/-	-/-	-/-			
トリグリセライド		-/-	△/-	-/-	-/-	-/-	-/-			
総蛋白		-/-	-/-	-/-	▼/-	-/-	-/-			
ASAT (GOT)		-/-	-/-	-/△	-/-	-/-	-/-			
ALAT (GPT)		-/-	-/-	-/-	-/△	-/-	-/-			
アルカリファスファターゼ		-/-	-/-	-/-	-/↑	-/-	-/△			

c) 対照群および 300 mg/kg 群の雄は投与後解剖動物を 7 匹、残り 5 匹を回復動物に供した。

d) 投与第 25 日に死亡

e) 分娩日において出生後の児なめおよび回集行動の欠如が認められ、死亡児が多発した。しかし、1 例だけの変化で哺育 1 日以後は哺育行動に異常がなかったことから一時的な変化と判断され、被験物質に起因する変化ではないと考えられる。

f) 投与 8 日～42 日までの間、対照群と比べ有意な低値を示した。

g) 妊娠 7 日の一過性の変化であった。

続き

用量 (mg/kg/day) 検査項目 [性] [動物数] ^{c)}	対照群	10	60	300	対照群	300	300	
	投与終了後				回復終了後		死亡/非妊娠	
	♂/♀ [7/12]	♂/♀ [12/12]	♂/♀ [12/12]	♂/♀ [6/11]	♂/♀ [5/5]	♂/♀ [5/5]	♂/♀ [1/1]	
(↑↓ : 傾向, △▽ : P<0.05, ▲▼ : P<0.01, - : 変化なし, *: 検査せず)								
雄の尿検査								
蛋白	-/*	-/*	-/*	▽ ^{h)} /*	*/*	*/*		
ケトン体	-/*	-/*	-/*	▽ ^{h)} /*	*/*	*/*		
器官重量								
副腎 絶対重量	-/-	-/-	-/-	△/-	-/-	↑/-	*	
相対重量	-/-	-/-	-/-	▲/△	-/-	▲/-		
腎臓 相対重量	-/-	-/-	-/-	-/△	-/-	-/-	*	
肝臓 相対重量	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/▲	*	
剖検所見	計画解剖動物[数]	[7/12]	[12/12]	[12/12]	[6/11]	[5/5]	[5/5]	[1/1]
胃 :								
前胃癒着	0/0	0/0	0/0	0/1	*/*	*/*	*/0	
前胃の壁肥厚	0/0	0/0	0/0	6/11	*/*	*/*	*/1	
前胃粘膜の潰瘍	0/0	0/0	0/0	0/1	*/*	*/*	*/0	
腺胃粘膜暗赤色化	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	1/0	
肝臓 :								
白色斑	0/0	0/0	0/0	0/1	*/*	*/*	*/*	
精巣 :								
小型化	0/*	0/*	0/*	2/*	*/*	*/*	*/*	
精巣上体 :								
小型化	0/*	0/*	0/*	2/*	*/*	*/*	*/*	
子宮 :								
拡張	*/*	*/*	*/*	*/*	*/1	*/0	*/0	
胸腺 :								
暗赤色化	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	1/0	
小腸 :								
十二指腸異常内容物	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	1/0	
空腸異常内容物	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	1/0	
回腸異常内容物	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	1/0	
膨張	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	1/0	
大腸 :								
膨張	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	1/0	
脾臓 :								
小型化	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	1/0	
肺 (気管支) :								
暗赤色化	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	1/0	

h) 毒性変化と考えられる陽性例の増加でないことから、偶発的な変化と判断した。

続き

検査項目 [性] [動物数] ^{c)}	用量 (mg/kg/day)		対照群	10	60	300	対照群	300	300	死亡/非妊娠
	投与終了後						回復終了後			
	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	
	[7/12]	[12/12]	[12/12]	[6/11]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[1/1]	
(↑ ↓ : 傾向, △▽ : P<0.05, ▲▼ : P<0.01, - : 変化なし, *: 検査せず)										
病理	計画解剖動物[数]	[7/12]	[12/12]	[12/12]	[6/11]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[1/1]	
	心臓 :	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[1/0]	
組織	心筋変性	+	2/0	*/*	*/*	2/1	*/*	*/*	0/*	
	胸腺 :	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[1/0]	
所見	萎縮	++	0/0	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	1/*	
	脾臓 :	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[1/0]	
赤芽球系、髓外造血	+	0/5	*/*	*/*	0/5	*/*	*/*	*/*	0/*	
	萎縮	+	0/0	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	1/*	
肺 (および気管) :		[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[1/0]	
	マクロファージ集簇	+	2/1	*/*	*/*	3/1	*/*	*/*	0/*	
出血		+	3/3	*/*	*/*	2/2	*/*	*/*	0/*	
	骨化生	+	2/2	*/*	*/*	0/1	*/*	*/*	0/*	
動脈壁の鉱質沈着		+	1/0	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	0/*	
	うつ血	+	0/0	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	1/*	
水腫		+	0/0	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	1/*	
	胃 :	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[6/11]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[1/1]	
前胃の限局性炎症性細胞浸潤	前胃の限局性炎症性細胞浸潤	+	0/0	0/0	0/0	▲ [0/1] ▲	0/0	3/2	0/0	
		++	0/0	0/0	0/0	6/9	0/0	0/0	1/0	
		+++	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	
腺胃のびらん	腺胃のびらん	+	0/1	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
	前胃限局性角化亢進	+	0/0	0/0	0/0	▲ 6/11 ▲	0/0	0/0	0/1	
前胃限局性扁平上皮過形成	前胃限局性扁平上皮過形成	+	0/0	0/0	0/0	▲ [0/0] ▲	0/0	5/5	0/0	
		++	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	
		+++	0/0	0/0	0/0	6/10	0/0	0/0	0/1	
		++++	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	
前胃の潰瘍	前胃の潰瘍	+	0/0	0/0	0/0	△ 2/2 ▲	0/0	0/0	0/1	
		++	0/0	0/0	0/0	3/6	0/0	0/0	0/0	
		+++	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	
腺胃の囊胞	腺胃の囊胞	+	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	
	腺胃の出血	+	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	
肝臓 :	限局性炎症性細胞浸潤		[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/6]	[0/0]	[0/0]	[1/0]	
	限局性肉芽腫性炎	++	2/1	*/*	*/*	3/2	*/*	*/*	0/*	
腎臓 :	限局性肝細胞壊死	+	0/0	*/*	*/*	0/1	*/*	*/*	0/*	
	好塩基性近位尿細管	+	1/0	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	0/*	
囊胞		[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[1/0]	
	硝子円柱	+	1/2	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	0/*	
間質のリンパ球浸潤		+	0/0	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	1/*	
	硝子円柱	+	2/0	*/*	*/*	0/0	*/*	*/*	0/*	
髓質の鉱質沈着	間質のリンパ球浸潤	+	1/1	*/*	*/*	2/0	*/*	*/*	0/*	
	髓質の鉱質沈着	+	2/2	*/*	*/*	1/1	*/*	*/*	0/*	

続き

検査項目 [性] [動物数] ^c	用量 (mg/kg/day)		対照群	10	60	300	対照群	300	300	死亡/非妊娠	
				投与終了後				回復終了後			
	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀		
	[7/12]	[12/12]	[12/12]	[6/11]	[5/5]	[5/5]	[1/1]				
(↑↓: 傾向, △▽: P<0.05, ▲▼: P<0.01, -: 変化なし, *: 検査せず)											
病理所見	精巣:	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[1/0]	
	精細管萎縮 +	0/*	2/*	0/*	△ 2/*	0/*	0/*	0/*	0/*	0/*	
	+++	0/*	0/*	0/*	1/*	0/*	1/*	0/*	0/*	0/*	
	++++	0/*	0/*	0/*	1/*	0/*	0/*	0/*	0/*	0/*	
	びまん性間細胞過形成 +	0/*	0/*	0/*	1/*	*/*	*/*	0/*	0/*	0/*	
	精巣上体:	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[1/0]	
	精巣上体管の萎縮 ++	0/*	0/*	0/*	1/*	0/*	0/*	0/*	0/*	0/*	
	管内細胞残屑 +	0/*	0/*	0/*	2/*	0/*	0/*	0/*	0/*	0/*	
	管内精子消失 +++	0/*	0/*	0/*	2/*	0/*	0/*	0/*	0/*	0/*	
	前立腺:	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[5/0]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[1/0]	
子宮:	間質のリンパ球浸潤 +	3/*	0/*	0/*	1/*	*/*	*/*	0/*	0/*	0/*	
	管腔の拡張 +	[0/5]	[0/0]	[0/0]	[0/5]	[0/1]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	
	下垂体:	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[1/0]	
	異所性頭蓋咽頭管組織 +	0/0	*/*	*/*	1/0	*/*	*/*	0/*	0/*	0/*	
	甲状腺:	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[5/5]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	[0/0]	
	異所性胸腺 +	0/0	*/*	*/*	1/0	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	
	鰓後体遺残 +	4/5	*/*	*/*	4/3	*/*	*/*	*/*	*/*	*/*	
	副腎:	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[5/5]	[1/0]	
	束状帶態細胞の限局性壞死 ++	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/*	

その他、異常所見の認められなかった器官・組織

脳、リンパ節（下頸、腸間膜）、盲腸、結腸、直腸、上皮小体、膀胱、精嚢（凝固腺含む）、卵巣、腎、骨髓（大腿骨）、坐骨神経、脊髄

2) 生殖発生毒性

検査項目 用量(mg/kg/day)	対照群	10	60	300
	♂/♀	♂/♀	♂/♀	♂/♀
(↑↓: 傾向, △▽: P<0.05, ▲▼: P<0.01, -: 変化なし, *: 検査せず)				
検査母動物[数]	[12]	[12]	[12]	[12]
Pregnancy Data				
平均性周期日数	4.00	4.17	4.00	4.09
異常性周期の発現数	0/12	0/12	0/12	1/12
交配対[数]	[12]	[12]	[12]	[12]
交尾率 Copulation Index (%) [数]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]
受胎率 Fertility Index (%) [数]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]	100.0 [12/12]	91.7 [11/12]
検査母動物[数]	[12]	[12]	[12]	[11]
黄体数	17.7	18.2	16.8	16.9
着床数	15.8	16.1	15.3	15.8
着床率 Implantation Index (%)	89.92	88.71	91.71	93.48
受胎雌数	12	12	12	11
生児出産雌数	12	12	12	11
出産率 Gestation Index (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
分娩動物[数]	[12]	[12]	[12]	[11]
妊娠期間 Gestation Length (days)	22.4	22.4	22.5	22.5
哺育異常	0	0	0	0
Litter Data				
出産児数 ⁱ⁾ (総出産児数)	14.6 (175)	14.8 (178)	14.1 (169)	14.8 (163)
分娩率 Delivery Index (%)	92.53	92.80	92.36	93.72
生存児数 (哺育 0 日)	14.5	14.6	14.0	14.2
出生率 Live Birth Index (%)	99.48	98.43	99.44	96.25
性比 (♂/♀) 分娩日	0.92	0.84	0.97	1.04
生存児数 (哺育 4 日)	14.3	14.5	13.9	13.4
新生児の 4 日生存率	Viability Index (%)	98.40	99.44	99.24
体重 哺育 0 日(g)	7.0/6.5	6.8/6.5	7.0/6.6	6.8/6.5
哺育 4 日(g)	10.9/10.3	11.2/10.7	11.2/10.7	10.7/10.5
体重増加量 哺育 0-4 日(g)	3.9/3.8	4.3/4.2	4.2/4.1	3.9/3.9
新生児				
外表異常の発現率 (%)	0.0	0.0	0.0	0.0
剖検所見	-	-	-	-

i) 1 腹当たりの平均出産児数

NOEL (mg/kg/day)	[反復投与毒性]	雄 : 60 mg/kg/day
	雌 :	60 mg/kg/day
	[生殖発生毒性]	親動物 : 雄 300 mg/kg/day
		雌 300 mg/kg/day
		児動物 : 300 mg/kg/day
NOEL の推定根拠	[反復投与毒性]	300 mg/kg 群で死亡が雄 1 例、体重増加の抑制が雄、流涎が雌雄、病理学検査では同群において前胃の扁平上皮の限局性過形成および角化亢進、限局性炎症性細胞浸潤、潰瘍形成が雌雄、精細管の萎縮が雄で認められた。この他に 300 mg/kg 群では、網赤血球数および白血球数の高値、ならびに総蛋白の低値が雄、ALAT (GPT) 活性および ALP 活性の高値が雌、副腎の絶対および相対重量の高値が雄、腎臓および副腎の相対重量の高値が雌で認められた。
	[生殖発生毒性]	生殖発生毒性への影響は親動物および新生児に対しても被験物質に起因する変化は認められなかった。

4. その他

試験実施施設	名 称	株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
	所在地	茨城県神栖市砂山 14 番地 電話 0479-46-2871 (代表) FAX 0479-46-2874 (代表)
試験責任者	職氏名	安全性第 2 研究部 副主任研究員 [REDACTED]
	経験年数	10 年間
試験番号		B 0 4 1 7 9 8
試験実施年月日		2005 年 8 月 1 日 ~ 2007 年 1 月 23 日

3. 試験実施概要

3.1 表題

1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのラットを用いた経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

3.2 試験番号

B041798

3.3 試験目的

1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンを経口投与した時の反復投与毒性および生殖発生毒性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

OECD ガイドライン No.422, March 22, 1996

3.5 適用 GLP

OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」

（厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準, 薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号, 平成 15 年 11 月 21 日）

3.6 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県神栖市砂山 14 番地

3.9 試験責任者

株式会社三菱化学安全科学研究所

5. 要約

1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンを 10, 60 および 300 mg/kg/day の用量で SD 系ラット [Crl:CD(SD)] の雌雄に交配前 14 日から交配を経て雄は計 42 日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育 4 日まで経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性、ならびにそれらの変化の回復性について検討した。1 群の動物数は雄で各 12 匹（回復動物含む）、雌で各 12 匹（回復動物として対照群および 300 mg/kg 群に各 5 匹を追加）とし、対照群には媒体（精製水）のみを投与した。

反復投与毒性

一般毒性学的な主要な変化として、300 mg/kg 群で死亡が雄 1 例、体重増加の抑制が雄、流涎が雌雄、病理学検査では同群において前胃の扁平上皮の限局性過形成および角化亢進、限局性炎症性細胞浸潤、潰瘍形成が雌雄、精細管の萎縮が雄で認められた。この他に 300 mg/kg 群では、網赤血球数および白血球数の高値、ならびに総蛋白の低値が雄、ALAT (GPT) 活性および ALP 活性の高値が雌、副腎の絶対および相対重量の高値が雄、腎臓および副腎の相対重量の高値が雌で認められた。これらの変化は 2 週間の回復期間により消失するか、あるいは回復傾向を示した。その他、詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定でも被験物質の影響はなく、神経症状を示唆する変化は認められなかった。

生殖発生毒性

親動物に対し性周期、交尾率、受胎率、分娩率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩および哺育行動、新生児に対しては出産児数、出生率、性比、新生児の 4 日生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンの本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも 60 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄の親動物および児動物とも 300 mg/kg/day と考えられる。

8. 結果

8.1 反復投与毒性

8.1.1 一般状態

結果を Tables 1-6, Appendices 1-6 に示す。

死亡が 300 mg/kg 群の雄 1 例（動物番号 00405）に認められた。死亡の 3 日前より呼吸不整およびラッセル音、死亡前日には自発運動低下、眼瞼下垂および被毛状態の異常が認められ、投与第 25 日に死亡した。

投与期間中の症状として流涎が 300 mg/kg 群の雄 11 例、雌 16 例で散見された。妊娠期間中に自発運動低下およびラッセル音が 300 mg/kg 群の雌 1 例（動物番号 50409），同動物では自発運動低下が哺育期間にも認められた。

その他、対照群の雌サテライト動物 1 例に歯の欠損がみられたが、3 日後には回復した。10 および 60 mg/kg 群の雌雄とも被験物質に起因する異常は認められなかった。

300 mg/kg 群の雄回復動物および雌サテライト動物では、投与の中止により流涎は消失した。

8.1.2 行動検査

8.1.2.1 詳細な症状観察

結果を Table 7, Appendices 7, 8 に示す。

投与期間中、雌雄とも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

8.1.2.2 機能検査

結果を Table 8, Appendices 9, 10 に示す。

刺激に対する反応性および握力測定の結果、雌雄とも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

8.1.2.3 自発運動量の測定

結果を Figs. 1, 2, Tables 9, 10, Appendices 11, 12 に示す。

雌雄とも各測定点および合計の運動量は、各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.3 体重

結果を Figs. 3-5, Tables 11-20, Appendices 13-22 に示す。

300 mg/kg 群の雄で体重増加の抑制が第 8 日から 42 日まで認められた。しかし、回復期間中には対照群と同等に推移し、回復傾向を示すものと考えられた。

10 および 60 mg/kg 群の雄、被験物質投与群の雌では対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.4 摂餌量

結果を Figs. 6-8, Tables 21-25, Appendices 23-27 に示す。

300 mg/kg 群の雌で妊娠 7 日、および同群の雌サテライト動物で第 22 日に摂餌量の低値を示したが、いずれも一過性の変化であった。同群の雄では対照群に比べ若干低値で推移したが、統計学的な有意差は認められなかった。

10 および 60 mg/kg 群の雌雄、回復動物の雌雄では対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.5 血液学検査

結果を Tables 26, 27, Appendices 28, 29 に示す。

投与期間終了後の検査では、網赤血球数の高値および白血球数の高値傾向が 300 mg/kg 群の雄に認められた。

回復期間終了後の検査では、血小板数の高値および白血球百分率好中球比の低値が 300 mg/kg 群の雄で認められたが、投与期間終了後の検査で差がないことから、偶発的な変化と考えられる。

雌では投与期間および回復期間終了後の検査とも対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.6 血液生化学検査

結果を Tables 28, 29, Appendices 30, 31 に示す。

投与期間終了後の検査では、総蛋白の低値が 300 mg/kg 群の雄、ALAT(GPT)活性の高値が同群の雌に認められた。また、ALP 活性が 300 mg/kg 群の雌で投与期間終了後では高値傾向を、回復期間終了では高値を示した。

この他、投与期間終了後の検査でグルコースおよびトリグリセライドの高値が 10 mg/kg 群の雄、ASAT(GOT)活性の低値が 60 mg/kg 群の雌で認められた。しかし、これらの変化は用量との関連がないことから、偶発的な変化と考えられる。

8.1.7 雄の尿検査

結果を Table 30, Appendix 32 に示す。

尿蛋白およびケトン体の陰性例の増加が 300 mg/kg 群で認められたが、毒性変化と考えられる陽性例の増加でないことから、偶発的な変化と考えられる。

8.1.8 器官重量

結果を Tables 31-36, Appendices 33-38 に示す。

投与期間終了後の検査で、副腎の絶対および相対重量の高値が 300 mg/kg 群の雄、腎臓および副腎の相対重量の高値が同群の雌で認められた。回復期間終了後の検査においても 300 mg/kg 群の雄の副腎は絶対重量の高値傾向、相対重量の高値が認められた。

この他、回復期間終了後の検査で肝臓の相対重量の高値が 300 mg/kg 群の雌で認められたが、投与期間終了後の検査および同群の雄では差がないことから、偶発的な変化と考えられる。

10, 60 mg/kg 群の雌雄では対照群との間に有意差は認められなかった。

8.1.9 剖検所見

結果を Table 37, Appendices 39, 40 に示す。

投与後解剖動物では、前胃壁の肥厚が 300 mg/kg 群の雌雄全例、前胃粘膜の潰瘍あるいは前胃と肝臓の癒着が 300 mg/kg 群の雌各 1 例に認められた。生殖器系の変化として、精巣および精巣上体の小型化が 300 mg/kg 群の雄 2 例（動物番号：00403, 00406）にみられ、1 例（動物番号：00403）は両側性、1 例（動物番号 00406）は片側性であった。回復後解剖動物では、これらの変化は認められなかった。

死亡動物では、腺胃粘膜の暗赤色化、十二指腸、空腸および回腸のタール様の異常内容物、回腸および盲腸の拡張が認められた。その他に、胸腺の暗赤色化、脾臓の小型化、肺の暗赤色化が認められた。

8.1.10 病理組織所見

結果を Table 38, Appendices 39, 40 に示す。

被験物質に起因すると考えられる変化が 300 mg/kg 群の雌雄の胃および雄の精巣、精巣上体で認められた。それらの発現状況を下表に示した。

文中表 1 被験物質に起因すると思われる病理組織変化とその発現状況

器官名 所見	性別 運命情報 用量 (mg/kg) 検査動物数	雄						雌					
		投与後解剖				回復後解剖		投与後解剖				回復後解剖	
		0 7	10 12	60 12	300 6	0 5	300 5	0 12	10 12	60 12	300 11	0 5	300 5
グレード													
胃	前胃扁平上皮の限局性過形成	+	<5>	<5>	<5>	<6>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<11>	<5>
		+++	0	0	0	6	0	0	0	0	0	10	0
		++++	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	前胃扁平上皮の角化亢進	+	0	0	0	6	0	0	0	0	0	11	0
	前胃の潰瘍	+	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0
		++	0	0	0	3	0	0	0	0	0	6	0
		+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	前胃の限局性炎症性細胞浸潤	+	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0
		++	0	0	0	6	0	0	0	0	0	9	0
		+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
精巣	精細管の萎縮		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>		
		+	0	2	0	2	0	0	0	0	0		
		++	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
		+++	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
	間質細胞の増殖	+	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
精巣上体	精巣上体管内の細胞残屑		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>		
		+	0	0	0	2	0	0	0	0	0		
	精子消失	++	++	0	0	0	2	0	0	0	0		
	精巣上体管の萎縮	++	0	0	0	1	0	0	0	0	0		

グレード: +, 軽微; ++, 軽度; +++, 中等度; +++, 重度

胃では、前胃扁平上皮の限局性過形成と角化亢進ならびに前胃粘膜下の限局性炎症性細胞浸潤が 300 mg/kg 群の雌雄全例に認められた。これらのうち、雄 5 例、雌 9 例では潰瘍を伴っていた。回復後解剖動物では、軽微な前胃扁平上皮の限局性過形成が 300 mg/kg 群の雌雄全例、軽微な限局性炎症性細胞浸潤が同群の雄 3 例、雌 2 例に認められ、いずれも投与後解剖動物に比べその程度が軽かった。

精巣では、精細管の萎縮が 300 mg/kg 群の雄 4 例、10 mg/kg 群の雄 2 例に認められた。300 mg/kg 群の 1 例に認められた重度な精細管の萎縮には間細胞のびまん性増生を伴っていた。一方、10 mg/kg 群でみられた精細管の萎縮は軽微な変化であり、60 mg/kg 群では認められておらず、用量との関連がないことから自然発生性の変化と判断した。回復後解剖動物では、300 mg/kg 群の 5 例中 1 例に精細管

の萎縮が認められた。

精巣上体では、精巣上体管内の細胞残屑が 300 mg/kg 群の雄 2 例、精子消失が 300 mg/kg 群の雄 2 例、精巣上体管の萎縮が 300 mg/kg 群の雄 1 例に認められた。これらの変化は精巣病変の程度を反映して発現していた。回復後解剖動物では、これらの変化は認められなかった。

この他、種々の組織変化が投与後および回復後解剖動物の対照群を含む各群で認められた。しかし、それらはラットでは非特異的に発現する変化であり、その発現状況に明らかな群差が見られないことから、被験物質とは関連のない変化と判断した。

死亡動物では、前胃扁平上皮の限局性過形成、限局性炎症性細胞浸潤、腺胃の出血、脾臓の萎縮、肺のうっ血、水腫、胸腺の萎縮が認められた。その他に、偶発的な腎臓の囊胞が認められた。

8.2 生殖生otoxicity

8.2.1 生殖機能

結果を Table 39, Appendices 41, 42 に示す。

性周期検査では、各群の平均性周期に変化はなく、被験物質による性周期の延長あるいは短縮は認められなかった。なお、異常性周期を示す動物が 300 mg/kg 群の 1 例（動物番号 50405）に認められたが、雄との同居により交尾が確認された。交配の結果、交配対全例が交尾し、交尾率、交尾所要日数、交尾成立までに逸した発情期の回数、ならびに受胎率のいずれにも被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。なお、300 mg/kg 群の非妊娠動物 1 例（動物番号 50403）の相手雄は、精巣および精巣上体に両側性の病変が認められた。

8.2.2 分娩および哺育状態

結果を Table 5, 40, Appendix 5, 43 に示す。

妊娠期間、黄体数、着床数、着床率および分娩率のいずれにも被験物質投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

哺育の観察では、300 mg/kg 群の 1 例（動物番号 50405）で分娩日において児なめおよび回集行動の欠如が認められ、雄 8 例雌 9 例を出産したが雄 4 例雌 3 例が死亡、哺育 1 日には雄 1 例だけが生存し他はすべて死亡した。哺育 1 日以後の哺育行動には異常は認められなかった。

他の母動物に分娩および哺育行動の異常は認められなかった。

8.2.3 新生児への影響

8.2.3.1 新生児の観察

結果を Tables 41, 42, 45, Appendices 44, 45, 48 に示す。

出産児数、出産生児数、出生率および新生児の 4 日生存率のいずれにも被験物質

投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。さらに、新生児の一般状態および外表検査では各群いずれにも被験物質に起因する異常は認められなかつた。

8.2.3.2 体重

結果を Tables 43, 44, Appendices 46, 47, 50 に示す。

雌雄の体重および体重増加量とも被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかつた。

8.2.3.3 剖検

結果を Table 46, Appendix 49 に示す。

生後 4 日の生存児の剖検および死亡児の剖検では、被験物質に起因する異常所見は認められなかつた。

9. 考察および結論

1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンを 10, 60 および 300 mg/kg の用量で SD 系ラット [Crl:CD(SD)] の雌雄に交配前 14 日から交配を経て雄は計 42 日間、 雌は妊娠、 分娩を経て哺育 4 日まで経口投与し、 反復投与毒性および生殖発生毒性、 ならびにそれらの変化の回復性について検討した。

反復投与毒性

死亡が 300 mg/kg 群の雄 1 例に認められ、 呼吸不整、 ラッセル音、 自発運動低下、 眼瞼下垂および被毛状態の異常を示し投与第 25 日に死亡した。 病理学検査の結果、 前胃扁平上皮の限局性過形成、 限局性炎症性細胞浸潤、 腺胃の出血、 ならびに衰弱性の変化が認められた。 生存動物では投与期間中の流涎が 300 mg/kg 群の雄 11 例、 雌 16 例で散見された。 また、 同群の雌 1 例に自発運動低下およびラッセル音が認められた。 製造者の製品安全データシート[1]によれば皮膚および眼に対し強い刺激性を有することから、 流涎や死亡動物の胃の変化は被験物質が有する刺激作用により誘発された変化と考えられる。 また、 体重増加の抑制が 300 mg/kg 群の雄で認められたが、 投与の中止により回復傾向を示した。 詳細な症状観察、 機能検査および自発運動量測定では被験物質の影響はなく、 神経症状を示唆する変化は認められなかった。

病理学検査の結果、 被験物質に起因すると考えられる主要な変化として、 前胃の扁平上皮の過形成および角化亢進、 限局性炎症性細胞浸潤、 潰瘍形成が 300 mg/kg 群の雌雄、 精細管の萎縮が同群の雄で認められた。

前胃粘膜の炎症や潰瘍は刺激性を有する化学物質を経口投与した場合によくみられる変化であり、 障害された組織の修復像として粘膜上皮の増生が認められる [3, 4]。 被験物質は皮膚および眼に対し強い刺激性を有しており[1]、 これら一連の変化が投与後解剖動物において認められた。 一方、 回復後解剖動物では潰瘍は認められず、 前胃扁平上皮の限局性過形成と限局性炎症性細胞浸潤が軽微であったことから、 雌雄ともに回復傾向を示しているものと考えられる。 また、 血液学検査において、 白血球数の高値が 300 mg/kg 群の雄で認められ、 前胃の炎症性変化と関連するものと考えられる。

精細管の萎縮が 300 mg/kg 群の雄 5 例中 4 例と高頻度に認められ、 被験物質に起因する変化と考えられる。 一方、 回復後解剖動物では精細管の萎縮が 1 例のみにみられたことから、 回復傾向を示しているものと考えられる。

血液学検査、 血液生化学検査および器官重量の結果、 300 mg/kg 群において、 網赤血球数の高値および総蛋白の低値が雄、 ALAT (GPT) 活性および ALP 活性の高値が雌、 副腎の絶対および相対重量の高値が雄、 腎臓および副腎の相対重量の高値が雌で、 いずれも投与期間終了後の検査で認められた。 回復期間終了後の検

査では、ALP 活性の高値が雌、副腎重量の高値が雄で認められた。しかし、前述の変化と関連すると考えられる病理組織学的な異常所見が認められていないことから、その影響の程度としては軽度なもの、あるいは毒性学的な意義に乏しい変化と考えられる。

被験物質に起因するこれらの変化は、回復期間により対照群と同様となるか、あるいは消失し、回復傾向を示しているものと考えられる。

生殖発生毒性

性周期、交尾率、受胎率、分娩率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩状態の観察では被験物質に起因する変化は認められなかった。哺育の観察では、300 mg/kg 群の 1 例に分娩日における出産後の児なめおよび回集行動の欠如が認められ、死亡児が多発した。しかし、1 例だけの変化で哺育 1 日以後は哺育行動の異常はみられなかったことから、分娩日における一時的な変化で被験物質に起因しない偶発的な変化と考えられる。

病理学検査において、300 mg/kg 群の雄では精巣および精巣上体に病変がみられたが、全例が交尾し 300 mg/kg 群の 1 例を除き受胎が成立した。精巣で產生された精子は精巣上体内を移動しながら成熟し、精巣上体尾部へ到達するのに約 2 週間を要し、その後射精する。投与初期に被験物質の影響を受けた精子は、約 2 週間後の交配開始頃に射精されることになる。よって、投与終了後の病理検査では精巣および精巣上体に変化がみられたが、交尾時期の精子は被験物質の影響を受けた可能性が低かったか、あるいは影響を受けてもその程度が軽かったものと予想され、受胎には影響しなかったものと推察される。なお、精巣および精巣上体の病変程度から、交配前の投与期間を 2 週間以上とした場合には、生殖機能への何らかの影響を示す可能性は否定できない。

新生児の検査において、出産児数、出産率、出生率および新生児の 4 日生存率、さらに一般状態、外表検査、体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。したがって、被験物質は次世代の発生および発育へ影響を及ぼすものではないと考えられる。

以上のように、1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンを反復経口投与した結果、一般毒性学的な主な変化として、300 mg/kg 群で死亡が雄 1 例、体重増加の抑制が雄、流涎が雌雄、病理学検査では同群において前胃への影響が雌雄、精巣および精巣上体への影響が認められた。これらの変化は 2 週間の回復期間により消失するか、あるいは回復傾向を示した。生殖発生毒性への影響は親動物および新生児に対しても被験物質に起因する変化は認められなかった。

したがって、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも 60 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄の親動物および児動物とも 300 mg/kg/day と考えられる。

Study No. B041798

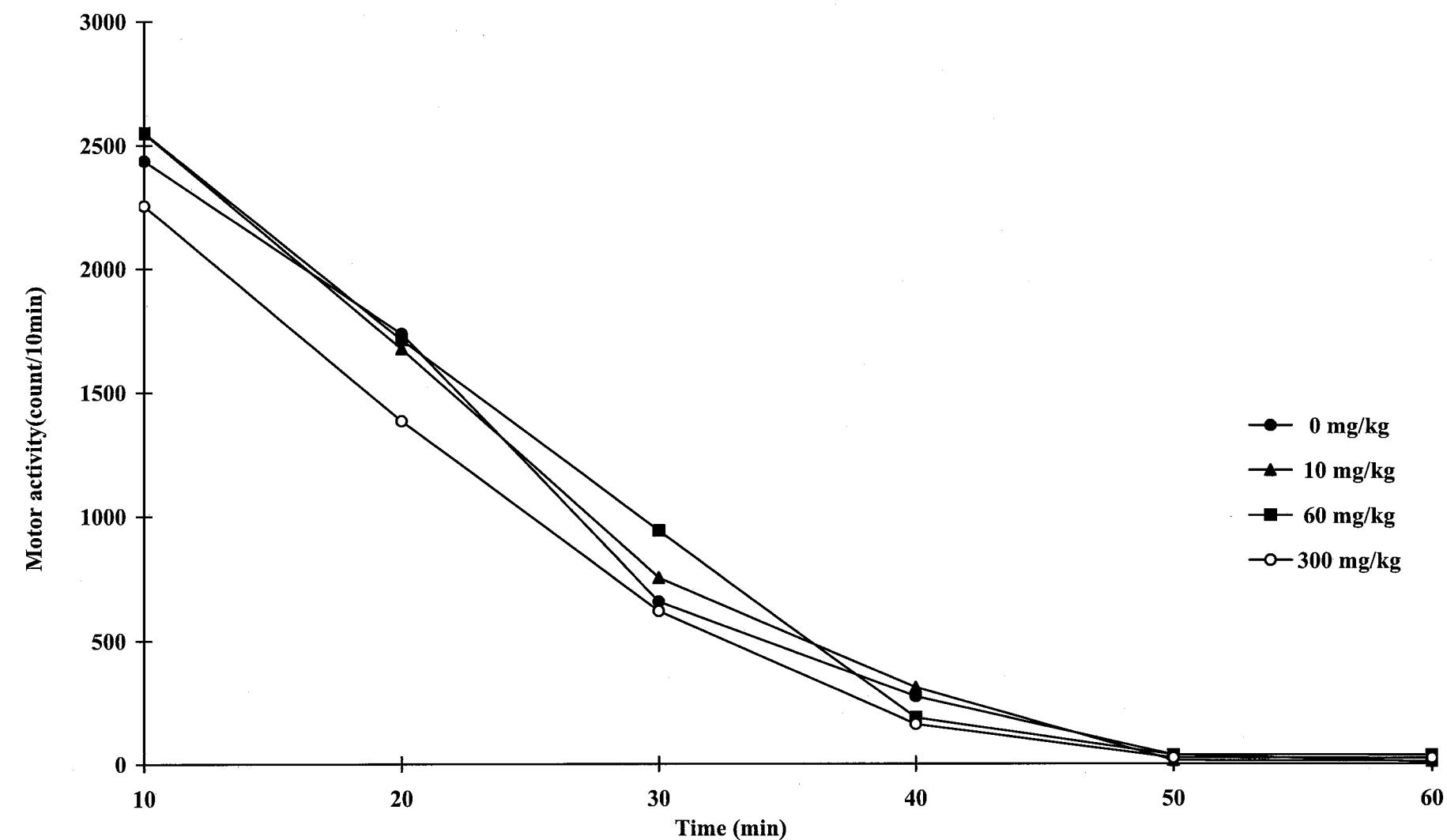


Fig.1 Motor Activity of male rats treated orally with 1,3-Bis (aminomethyl) cyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

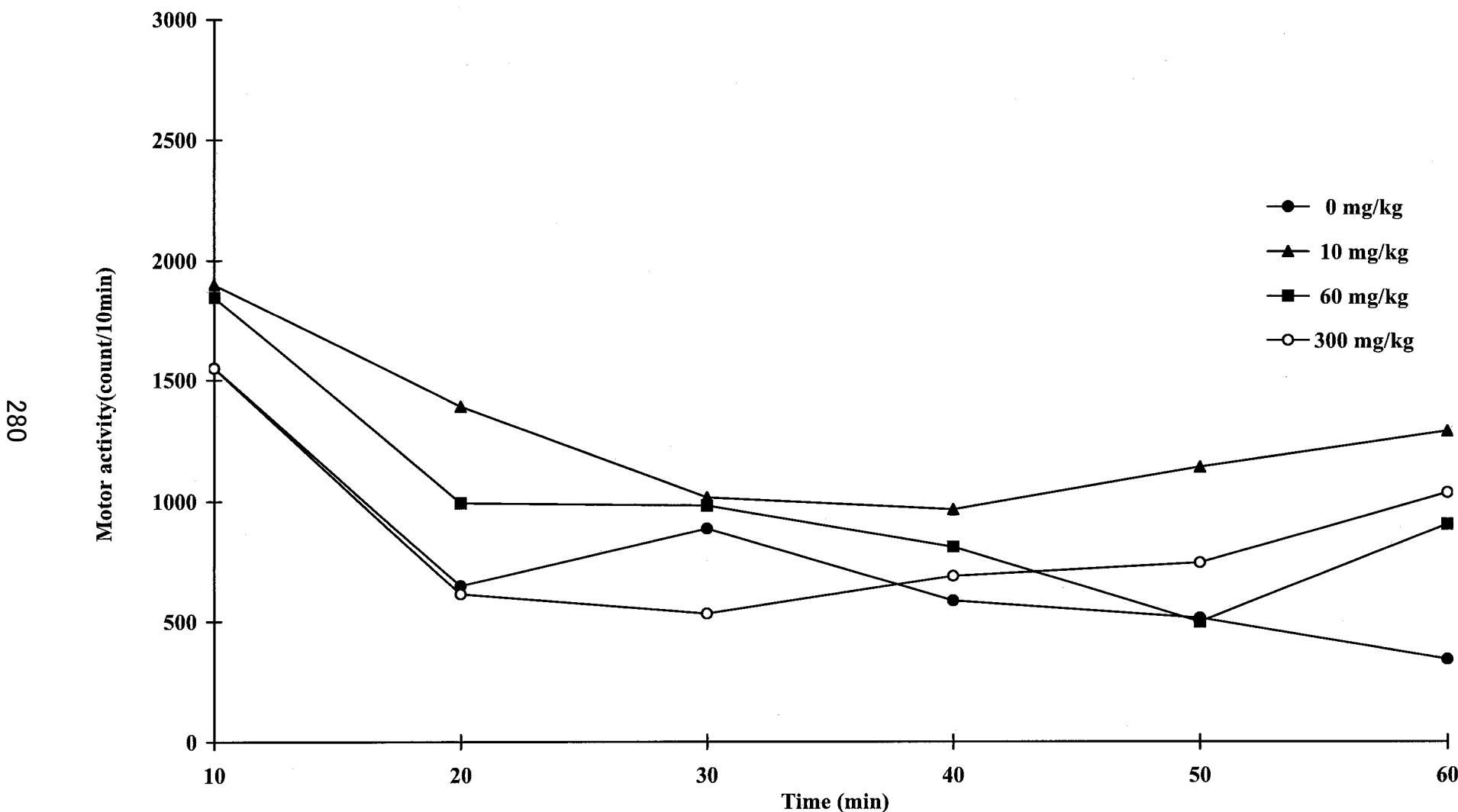


Fig.2 Motor Activity of female rats treated orally with 1,3-Bis (aminomethyl) cyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

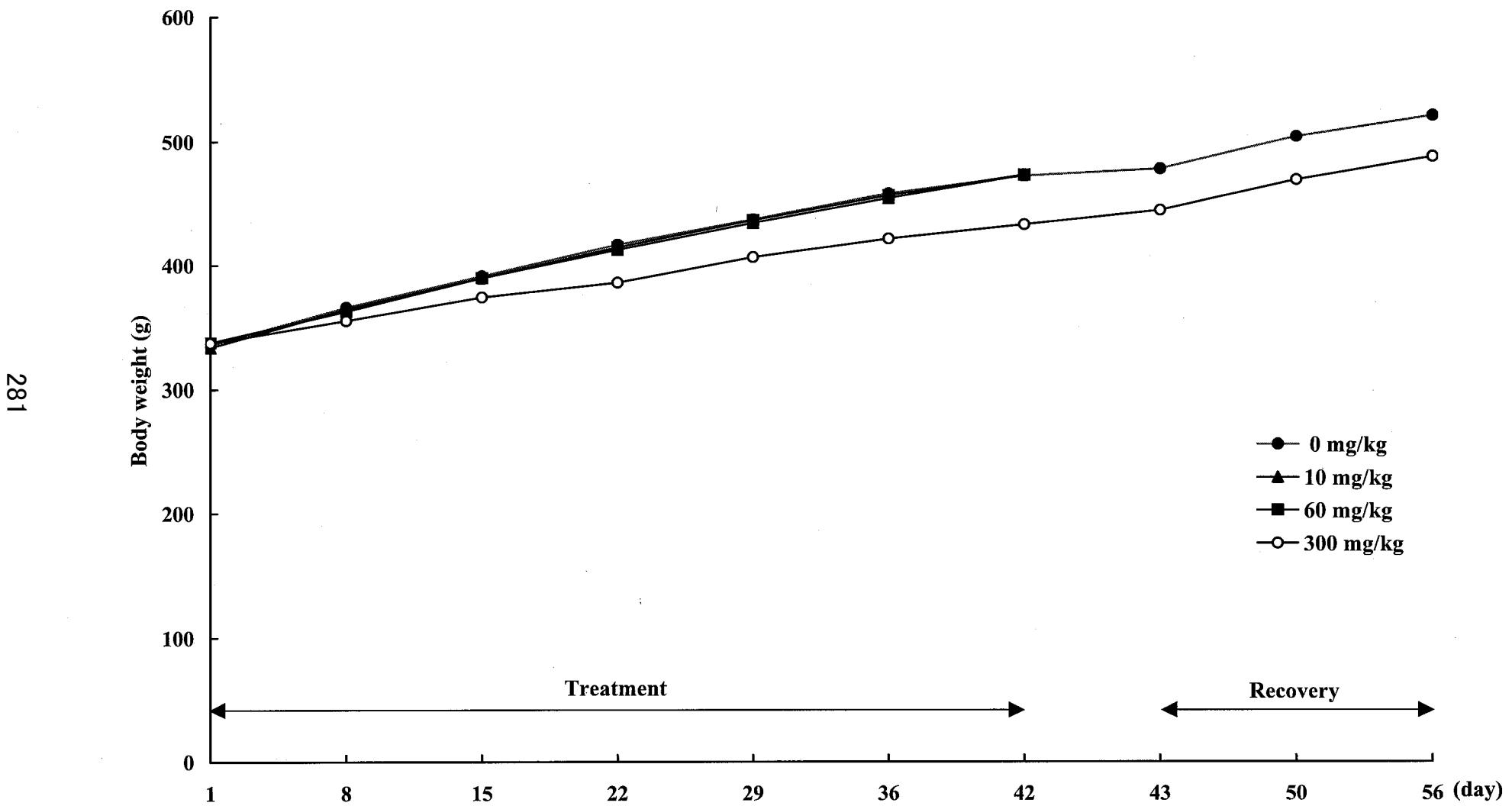


Fig.3 Body weight changes of male rats treated orally with 1,3-Bis (aminomethyl) cyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

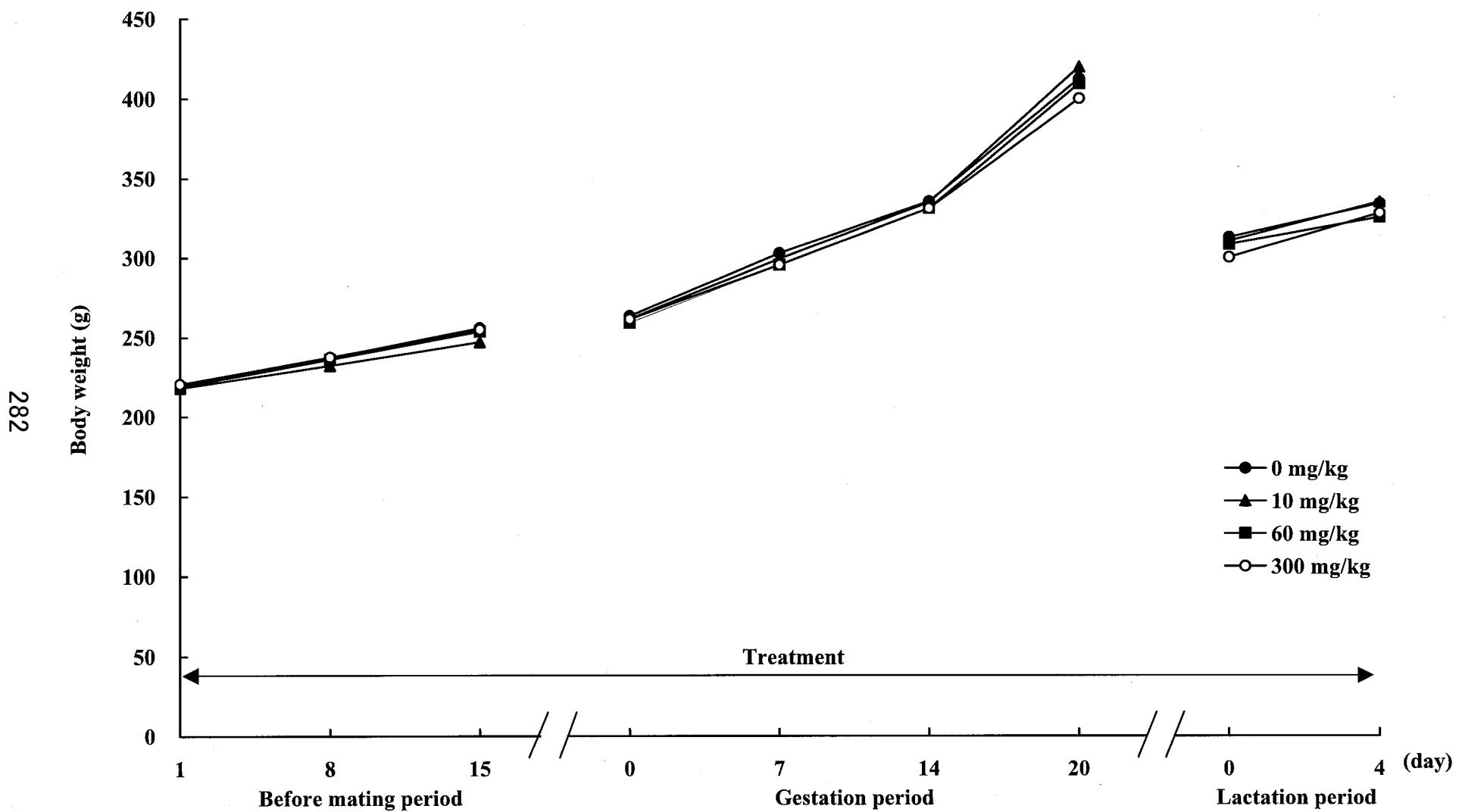


Fig.4 Body weight changes of female rats treated orally with 1,3-Bis (aminomethyl) cyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

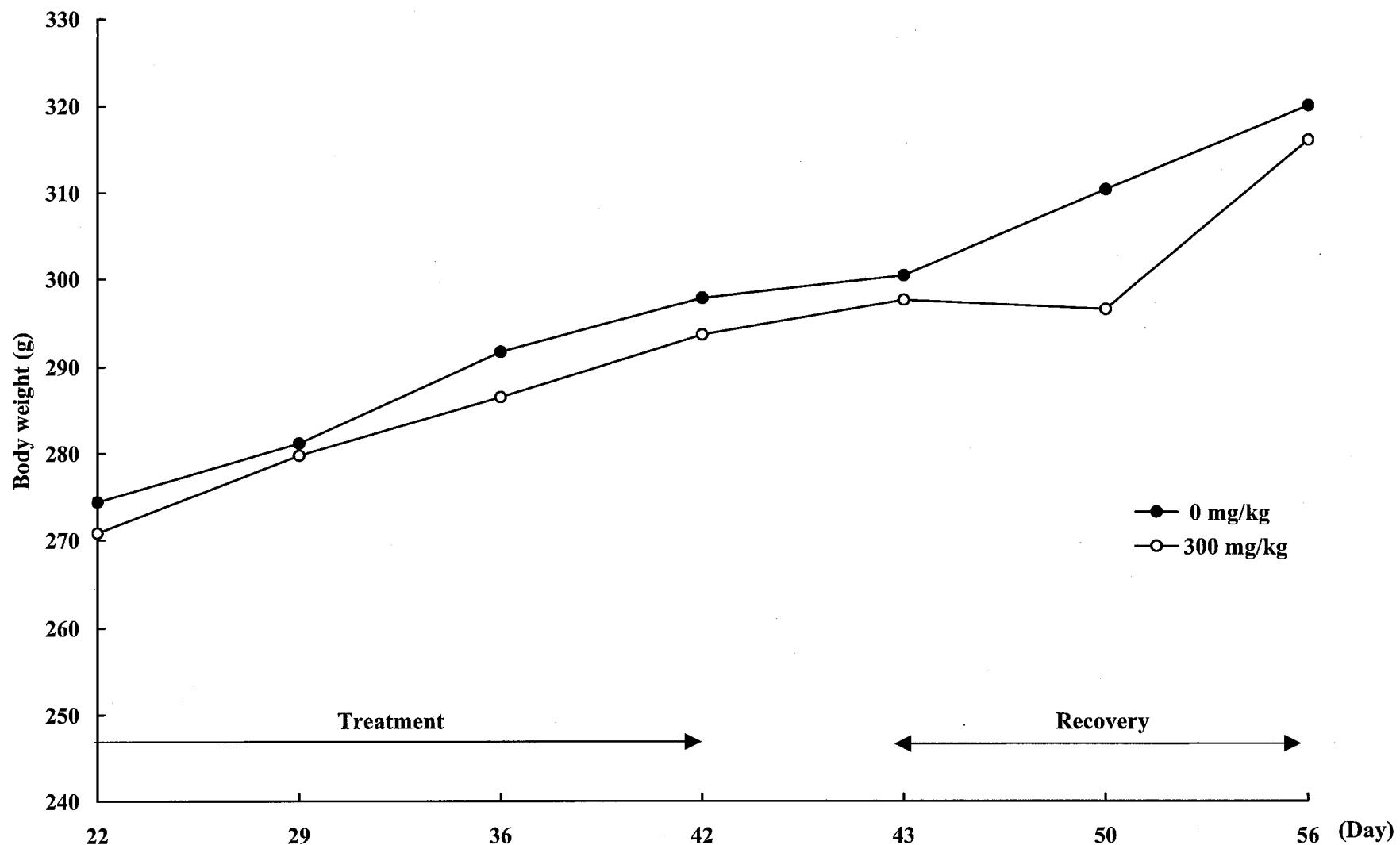


Fig.5 Body weight changes of female rats (satellite animal) treated orally with 1,3-Bis (aminomethyl) cyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

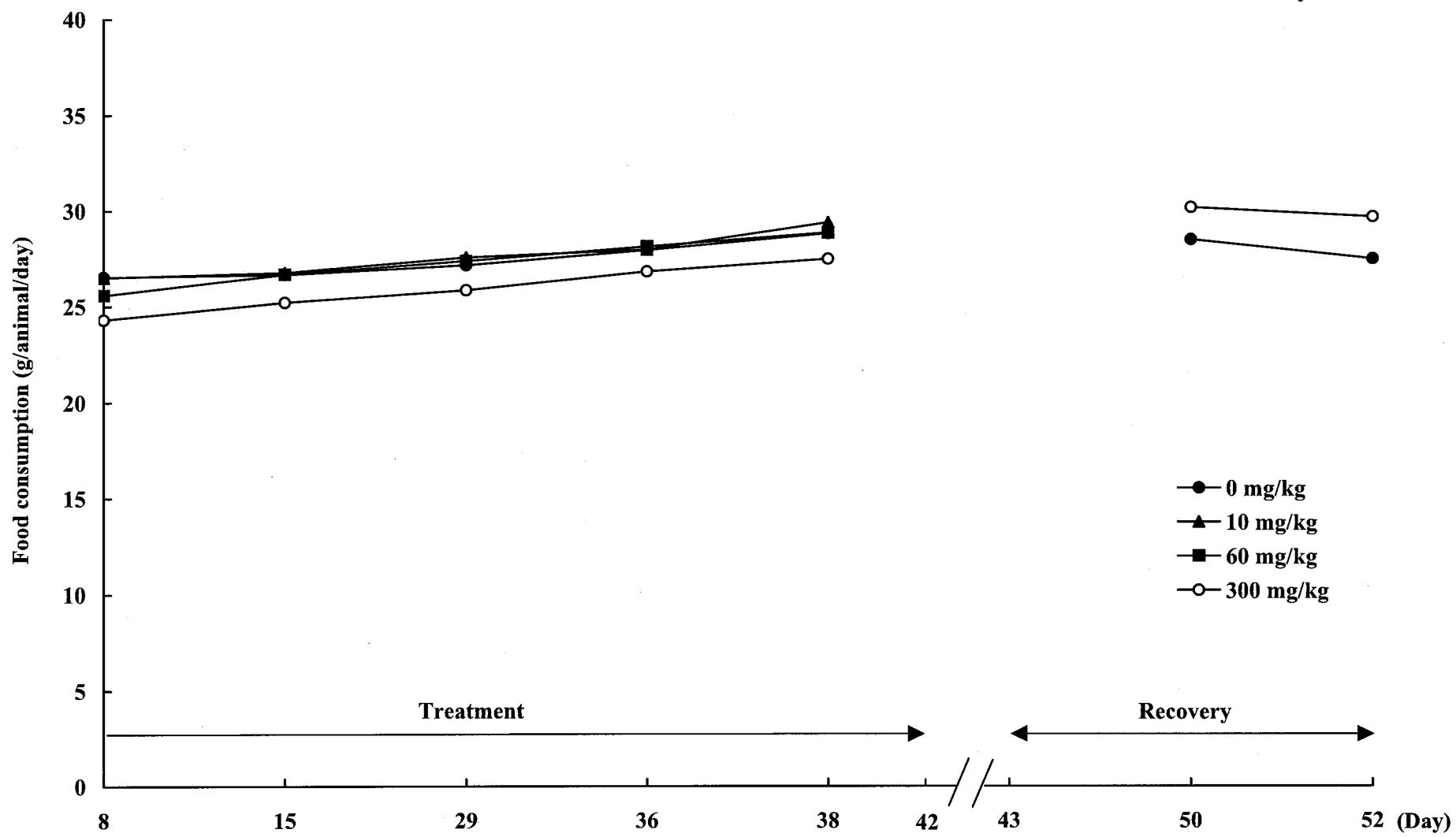


Fig.6 Food consumption of male rats treated orally with 1,3-Bis (aminomethyl) cyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

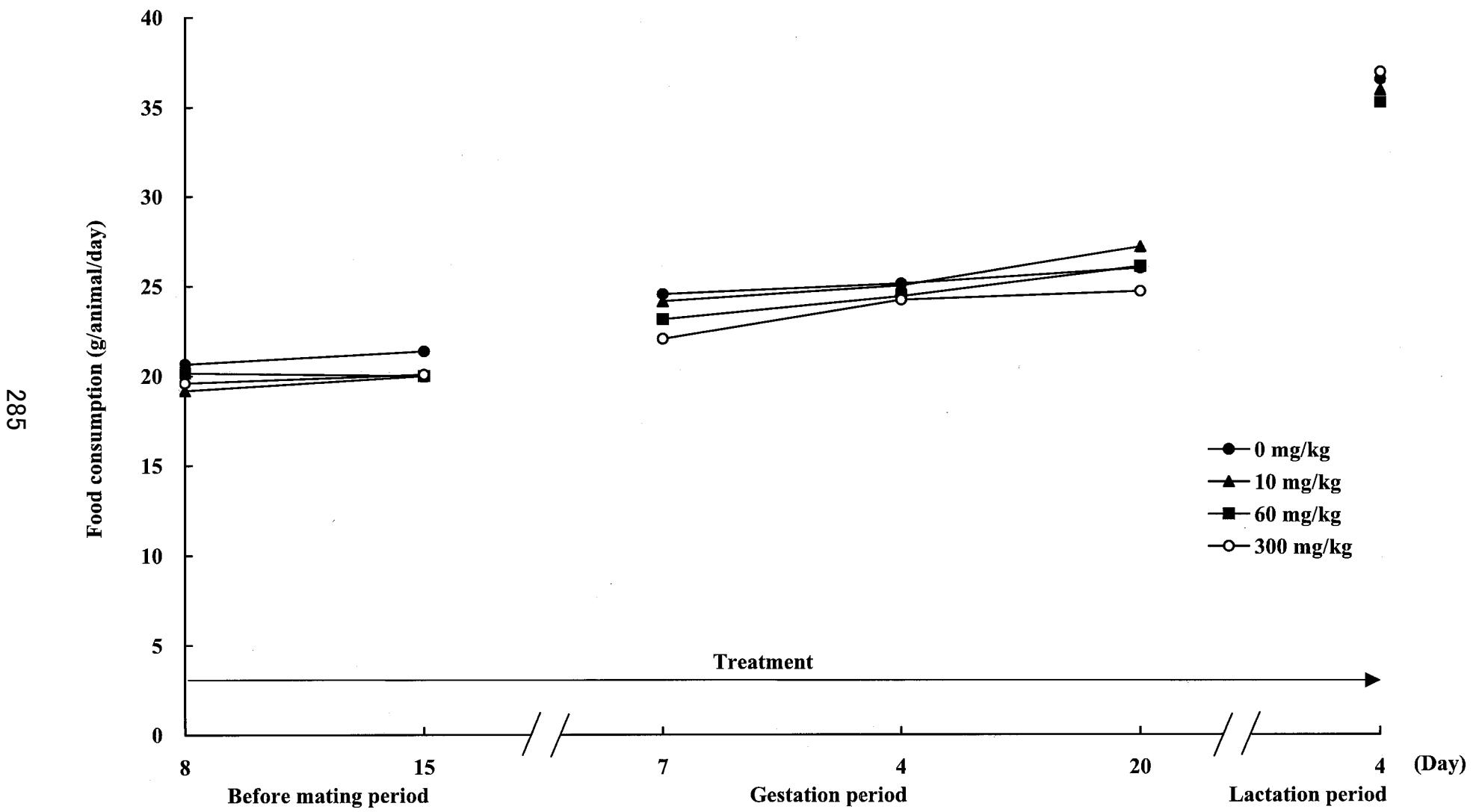


Fig.7 Food consumption of female rats treated orally with 1,3-Bis (aminomethyl) cyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

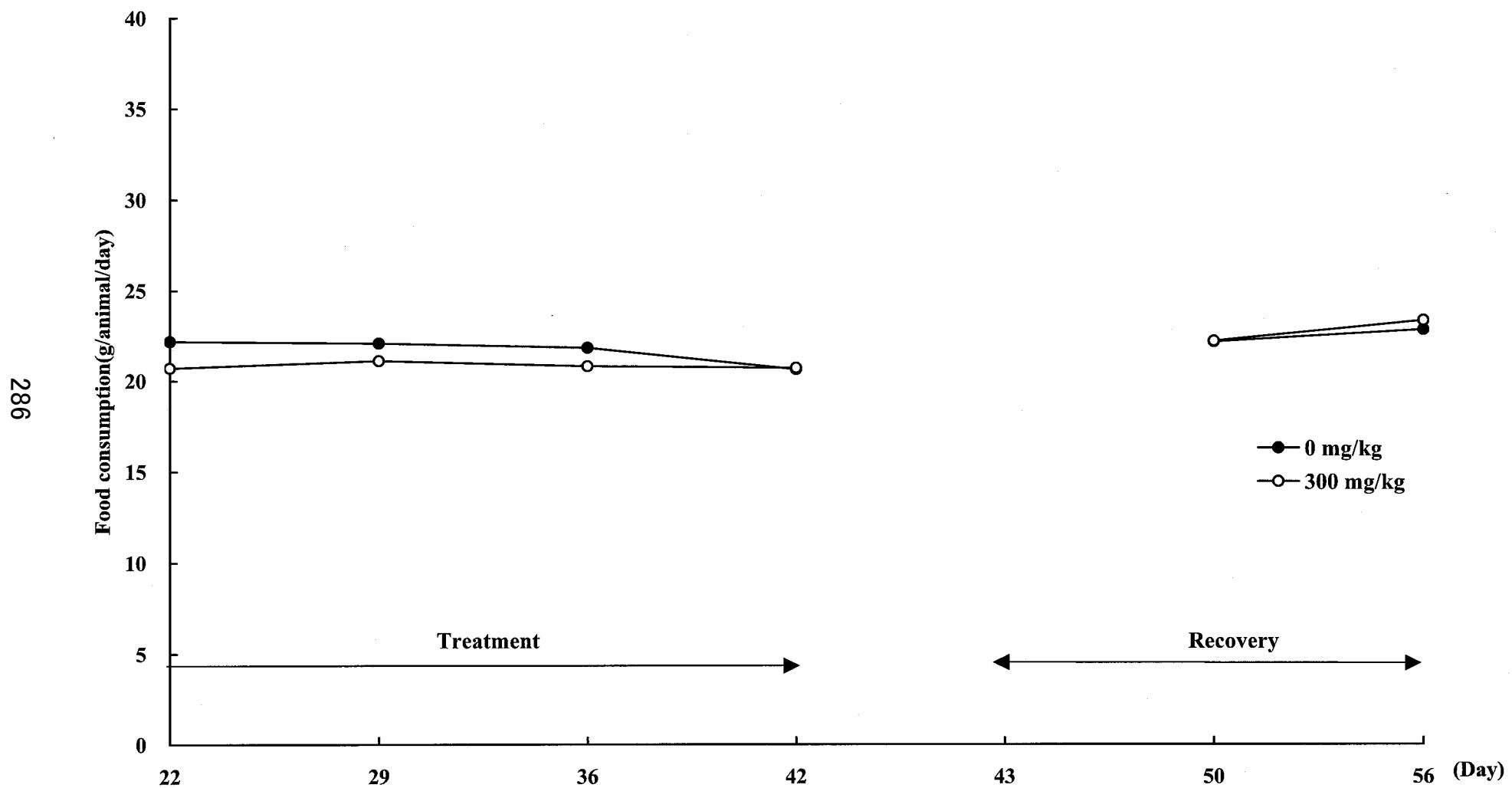


Fig.8 Food consumption of female rats (satellite animal) treated orally with 1,3-Bis (aminomethyl) cyclohexane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Clinical Sign - Summary

Study No. B041798

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day Time	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
			10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10
1, 3-BAC 0	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 10	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 60	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 300	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Death	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Decrease in locomotor activity	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Irregular respiration	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Rate	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abnormal fur 01	Abnormal fur	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Ptosis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Salivation	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	4	0	
												0	1	0	3	0	2	0	

+ , Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

Time 10 , Before dosing; Time 20 , After dosing;

01 , Whole body;

Table 1 Clinical Sign - Summary

Study No. B041798

Test Substance Dose(mg/kg)	Findings	Day	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
		Time	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10
1, 3-BAC 0	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 10	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 60	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 300	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	7	12	6	12	3	12	5	11	4	11	6	11	5	11	5	11
	Death	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Decrease in locomotor activity	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	Irregular respiration	+	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	Rale	+	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	Abnormal fur	01	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	Ptosis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	Salivation	1	0	5	0	6	0	9	0	7	0	8	0	5	0	6	0	6	0

+ , Present; 1 , Slight; 2 , Moderate; 3 , Severe;

Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

01 , Whole body;

Table 1 Clinical Sign - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day	Male																														
			35 Time	10	20	36 10	20	37 10	20	38 10	20	39 10	20	40 10	20	41 10	20	42 10	20	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
1, 3-BAC 0	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
1, 3-BAC 10	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
1, 3-BAC 60	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
1, 3-BAC 300	Number of Animals		11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality		11	3	11	3	11	2	11	2	11	5	11	6	11	4	11	4	11	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Death	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Decrease in locomotor activity	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Irregular respiration	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Rale	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Abnormal fur 01	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Ptosis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	1	0	8	0	8	0	9	0	9	0	6	0	5	0	7	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

01, Whole body;

Table 2 Clinical Sign - Summary

Study No. B041798

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
		Time	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10
1, 3-BAC 0	Number of Animals		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
	No Abnormality		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
1, 3-BAC 10	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 60	Number of Animals		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No Abnormality		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 300	Number of Animals		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
	No Abnormality		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
	Salivation		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	4
													0	3	0	4	
													0	3	0	5	
													0	5	0	5	

+ , Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

Table 3 Clinical Sign - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day Time	Female (Mating period)																								
			16 10	16 20	17 10	17 20	18 10	18 20	19 10	19 20	20 10	20 20	21 10	21 20	22 10	22 20	23 10	23 20	24 10	24 20	25 10	25 20	26 10	26 20	27 10	27 20	28 10
1, 3-BAC 0	Number of Animals		7	7	4	4	4	4																			
1, 3-BAC 0	No Abnormality		7	7	4	4	4	4																			
1, 3-BAC 10	Number of Animals		10	10	8	8	4	4	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1, 3-BAC 10	No Abnormality		10	10	8	8	4	4	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1, 3-BAC 60	Number of Animals		9	9	4	4	2	2																			
1, 3-BAC 60	No Abnormality		9	9	4	4	2	2																			
1, 3-BAC 300	Number of Animals		11	11	8	8	3	3	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1, 3-BAC 300	No Abnormality		11	5	8	5	3	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Salivation			6		3		2																			

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

Table 4

Study No. B041798

C
C

Clinical Sign (F0 Gestation) - Summary
Sex : Female Time 10 : Before dosing

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	/Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5
1, 3-BAC 0	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5
1, 3-BAC 10	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5
1, 3-BAC 60	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6
1, 3-BAC 300	Number of animals	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	6
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	11	6
	Rate																								

Table 4
Table Continued

Study No. B041798

Clinical Sign (F0 Gestation) - Summary
Sex : Female Time 20 : After dosing

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	/Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1, 3-BAC 0	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	
1, 3-BAC 10	Number of animals	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	
	No abnormality	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	
1, 3-BAC 60	Number of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	
1, 3-BAC 300	Number of animals	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	6	
	No abnormality	8	8	8	7	10	8	8	6	7	10	9	7	10	9	7	10	9	8	6	7	6	8	3	
	Decrease in locomotor activity																								
	Rale																								
	Salivation	3	3	3	4	1	3	3	5	4	1	2	4	1	2	3	5	4	5	4	3	5	6	3	

Table 5

Study No. B041798

C
C

Clinical Sign (F0 Lactation) - Summary
Sex : Female Time 10 : Before dosing

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	/Day	0	1	2	3	4	5
			12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 0	Number of animals		12	12	12	12	12	12
	No abnormality		12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 10	Number of animals		12	12	12	12	12	12
	No abnormality		12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 60	Number of animals		12	12	12	12	12	12
	No abnormality		12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 300	Number of animals		11	11	11	11	11	11
	No abnormality		10	11	11	11	11	11
	Loss of licking pups		1	1				
	Loss of retrieving							

Table 5
Table Continued

Study No. B041798

Clinical Sign (F0 Lactation) - Summary
Sex : Female Time 20 : After dosing

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	/Day				
		0	1	2	3	4
1, 3-BAC 0	Number of animals	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 10	Number of animals	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 60	Number of animals	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 300	Number of animals	11	11	11	11	11
	No abnormality	4	9	7	7	9
	Decrease in locomotor activity	1	1			
	Salivation	7	2	4	4	2
	Loss of licking pups	1				
	Loss of retrieving	1				

Table 6 Clinical Sign - Summary

Study No. B041798

Test Substance Dose(mg/kg)	Findings	Day Time	Female #																																		
			16 10	16 20	17 10	17 20	18 10	18 20	19 10	19 20	20 10	20 20	21 10	21 20	22 10	22 20	23 10	23 20	24 10	24 20	25 10	25 20	26 10	26 20	27 10	27 20	28 10	28 20	29 10	29 20	30 10	30 20	31 10	31 20	32 10	32 20	
1, 3-BAC 0	Number of Animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	No Abnormality		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Loss of teeth	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1, 3-BAC 300	Number of Animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality		5	4	5	4	5	3	5	4	5	3	5	3	5	3	5	3	5	4	5	4	5	5	5	2	5	3	5	2	5	2	5	2	5	2	5
	Salivation		1	0	1	0	1	0	2	0	1	0	2	0	2	0	2	0	1	0	1	0	0	3	0	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

Time 10, Before dosing;

Time 20, After dosing;

: Satellite animal

Table 6 Clinical Sign - Summary

Study No. B041798

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day Time	Female #																								
			33 10	34 20	35 10	36 20	37 10	38 20	39 10	40 20	41 10	42 20	43 10	44 20	45 10	46 20	47 10	48 20	49 10	50 20	51 10	52 20	53 10	54 20	55 10	56 20	
1, 3-BAC 0	Number of Animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5
	Loss of teeth	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1, 3-BAC 300	Number of Animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	No Abnormality		5	4	5	2	5	3	5	2	5	2	5	1	5	3	5	3	5	4	5	5	5	5	5	5	5
	Salivation	1	0	1	0	3	0	2	0	3	0	3	0	4	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

Time 10, Before dosing; Time 20, After dosing;

: Satellite animal

Table 6 Clinical Sign - Summary

Study No. B041798

Female #

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day 57
1, 3-BAC 0	Number of Animals No Abnormality Loss of teeth	5 5 + 0
1, 3-BAC 300	Number of Animals No Abnormality Salivation	5 5 1 0

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

#:Satellite animal

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week -1)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
Home cage observations	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Tremor	(Criteria)	N	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion		N	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing		N	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal from the cage		1	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week -1)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: 1, 3-BAC	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
	Dose (mg/kg):	12	12	12	12	17	12	12	17
	Number of Animals:	(Criteria)							
Hand-held observations									
Reactivity to handling		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	12	12	12	17	12	12	17
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N		12	12	12	17	12	12	17
	P		0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N		12	12	12	17	12	12	17
	P		0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N		12	12	12	17	12	12	17
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N		12	12	12	17	12	12	17
	P		0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N		12	12	12	17	12	12	17
	P		0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1		12	12	12	17	12	12	17
	2		0	0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0	0
	4		0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N		12	12	12	17	12	12	17
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N		12	12	12	17	12	12	17
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week -1)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC							
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations	(Criteria)								
Lacrimation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	5.8	5.1	3.0	3.7	8.7	10.1	5.0	4.2
	S. D.	4.5	3.7	2.4	4.0	3.8	4.7	3.2	3.9
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	12	12	12	17	12	12	17
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	10	11	12	12	11	6	12	17
	P	2	1	0	0	6	6	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week -1)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: 1, 3-BAC	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
	Dose (mg/kg):	12	12	12	12	17	12	12	17
	Number of Animals:								
Open field observations	(Criteria)								
Defecation	N	7	5	6	10	16	11	11	17
	P	5	7	6	2	1	1	1	0
Posture, body position	N	12	12	12	12	17	12	12	17
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12	17
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Gait	N	12	12	12	12	17	12	12	17
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week -1)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: 1, 3-BAC	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
	Dose (mg/kg):	12	12	12	12	17	12	12	17
	Number of Animals:								
Open field observations	(Criteria)								
Clonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypy	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

304

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 1)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Home cage observations		(Criteria)							
Tremor		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Breathing		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal from the cage		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	12	12	12	12	17	12	12
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
		6	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 1)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: 1, 3-BAC	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations (Criteria)									
Reactivity to handling		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	12	12	12	12	17	12	12
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N		12	12	12	12	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N		12	12	12	12	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N		12	12	12	12	17	12	12
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N		12	12	12	12	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N		12	12	12	12	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1		12	12	12	12	17	12	12
	2		0	0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0	0
	4		0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N		12	12	12	12	17	12	12
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N		12	12	12	12	17	12	12
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 1)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC							
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations	(Criteria)								
Lacrimation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	8.3	2.8	3.3	2.5	8.7	10.1	5.0	4.2
	S. D.	6.3	2.5	3.1	2.9	3.8	4.7	3.2	3.9
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	12	12	12	17	12	12	17
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	11	10	10	9	17	12	12	16
	P	1	2	2	3	0	0	0	1

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 1)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: Dose (mg/kg):	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations									(Criteria)
Defecation	N	7	7	4	7	17	12	12	17
	P	5	5	8	5	0	0	0	0
Posture, body position	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Gait	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 1)

Items	Sex:	Male				Female				
		Test Substance: 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	
	Dose (mg/kg):	12	12	12	12	17	12	12	17	
	Number of Animals:	(Criteria)								
Open field observations										
Clonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	
Stereotypy	N	12	12	12	12	17	12	12	17	
	P	0	0	0	0	0	0	0	0	
Bizarre behaviour	N	12	12	12	12	17	12	12	17	
	P	0	0	0	0	0	0	0	0	

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 2)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: 1, 3-BAC	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 12	1, 3-BAC 17
	Dose (mg/kg):	12	12	12	12	17	12	12	17
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Home cage observations		(Criteria)							
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal from the cage	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 2)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC							
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations	(Criteria)								
Reactivity to handling		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	12	12	12	17	12	12	17
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N		12	12	12	17	12	12	17
	P		0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N		12	12	12	17	12	12	17
	P		0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N		12	12	12	17	12	12	17
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N		12	12	12	17	12	12	17
	P		0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N		12	12	12	17	12	12	17
	P		0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1		12	12	12	17	12	12	17
	2		0	0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0	0
	4		0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N		12	12	12	17	12	12	17
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N		12	12	12	17	12	12	17
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 2)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC							
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations	(Criteria)								
Lacrimation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	4.3	2.2	3.3	2.2	7.6	9.3	7.6	6.7
	S. D.	5.8	1.8	2.9	2.6	5.6	5.5	5.7	5.1
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	12	12	12	17	12	12	17
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	8	8	12	12	16	9	11	15
	P	4	4	0	0	1	3	1	2

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 2)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: Dose (mg/kg):	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations									(Criteria)
Defecation	N	8	9	8	12	16	11	11	17
	P	4	3	4	0	1	1	1	0
Posture, body position	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Gait	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 2)

Items	Sex:	Male				Female			
		1, 3-BAC							
	Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300
	Dose (mg/kg):								
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17

Open field observations	(Criteria)								
	N	12	12	12	12	17	12	12	17
Clonic convulsion	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypy	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 3)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: Dose (mg/kg):	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Home cage observations									(Criteria)
Tremor	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal from the cage	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	12	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 3)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: Dose (mg/kg):	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations									(Criteria)
Reactivity to handling		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	12	12	12	12	17	12	12
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N		12	12	12	12	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N		12	12	12	12	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N		12	12	12	12	17	12	12
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N		12	12	12	12	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N		12	12	12	12	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1		12	12	12	12	17	12	12
	2		0	0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0	0
	4		0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N		12	12	12	12	17	12	12
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N		12	12	12	12	17	12	12
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 3)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: Dose (mg/kg):	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Hand-held observations		(Criteria)							
Lacrimation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	5.6	4.3	4.3	2.4	5.5	4.4	6.2	6.1
	S. D.	5.9	2.4	3.7	2.9	4.6	3.7	5.1	5.3
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	12	12	12	17	12	12	17
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	8	11	6	9	14	11	12	16
	P	4	1	6	3	3	1	0	1

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 3)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations		(Criteria)							
Defecation		N	9	10	7	11	14	12	12
		P	3	2	5	1	3	0	0
Posture, body position		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Breathing		N	12	12	12	11	17	12	12
		1	0	0	0	1	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement		N	12	12	12	12	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0	0
Gait		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
		6	0	0	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0	0	0
Tremor		N	12	12	12	12	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 3)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: Dose (mg/kg):	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	12	17	12	12	17
Open field observations									(Criteria)
Clonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypy	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour	N	12	12	12	12	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 4)

Items	Sex:	Male				Female				
		Test Substance: 1, 3-BAC	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	
	Dose (mg/kg):	12	12	12	11	17	12	12	17	
	Number of Animals:									
Home cage observations		(Criteria)								
Tremor	N	12	12	12	11	17	12	12	17	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
Clonic convulsion	N	12	12	12	11	17	12	12	17	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tonic convulsion	N	12	12	12	11	17	12	12	17	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	
Breathing	N	12	12	12	11	17	12	12	17	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hand-held observations										
Reactivity on removal from the cage	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	12	12	12	11	17	12	12	17	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 4)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: Dose (mg/kg):	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17
Hand-held observations									(Criteria)
Reactivity to handling	N	1	0	0	0	0	0	0	0
	N	2	12	12	12	11	17	12	12
	N	3	0	0	0	0	0	0	0
	N	4	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N		12	12	12	11	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N		12	12	12	11	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N		12	12	12	11	17	12	12
	N	1	0	0	0	0	0	0	0
	N	2	0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N		12	12	12	11	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N		12	12	12	11	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	N	1	12	12	12	11	17	12	12
	N	2	0	0	0	0	0	0	0
	N	3	0	0	0	0	0	0	0
	N	4	0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N		12	12	12	11	17	12	12
	N	1	0	0	0	0	0	0	0
	N	2	0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N		12	12	12	11	17	12	12
	N	1	0	0	0	0	0	0	0
	N	2	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

321

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 4)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
	Dose (mg/kg):	12	12	12	11	17	12	12	17
	Number of Animals:	(Criteria)							
Hand-held observations	Lacrimation	N	12	12	12	11	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	N	12	12	12	11	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
	Piloerection	N	12	12	12	11	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0	0
	Pupil size	N	12	12	12	11	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations	Rearing	Mean	6.8	3.0	3.0	0.2	6.1	6.7	5.9
		S. D.	5.4	2.6	2.3	0.4	4.0	4.0	4.1
	Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	12	12	12	11	17	12	12
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
	Urination	N	10	12	12	11	16	10	9
		P	2	0	0	0	1	2	1

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 4)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
	Dose (mg/kg):	12	12	12	11	17	12	12	17
	Number of Animals:								
Open field observations	(Criteria)								
Defecation	N	10	11	12	11	17	11	12	16
	P	2	1	0	0	0	1	0	1
Posture, body position	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Gait	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 4)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: 1, 3-BAC	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
	Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17
Open field observations									(Criteria)
Clonic convulsion		N	12	12	12	11	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion		N	12	12	12	11	17	12	12
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypy		N	12	12	12	11	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour		N	12	12	12	11	17	12	12
		P	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 5)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: Dose (mg/kg):	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17
Home cage observations		(Criteria)							
Tremor	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	11	17	12	12	16
	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal from the cage	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	11	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 5)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
	Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17
Hand-held observations									(Criteria)
Reactivity to handling		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	12	12	12	11	17	12	17
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
Aggression		N	12	12	12	11	17	12	17
		P	0	0	0	0	0	0	0
Trauma		N	12	12	12	11	17	12	17
		P	0	0	0	0	0	0	0
Color of skin		N	12	12	12	11	17	12	17
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur		N	12	12	12	11	17	12	17
		P	0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos		N	12	12	12	11	17	12	17
		P	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure		1	12	12	12	11	17	12	17
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva		N	12	12	12	11	17	12	17
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
Secretion		N	12	12	12	11	17	12	17
		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 5)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: 1, 3-BAC	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17
Hand-held observations									(Criteria)
Lacrimation	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing	Mean	7.0	5.8	5.3	4.2	4.3	3.1	5.8	7.6
	S. D.	6.0	3.1	4.2	2.9	2.6	2.1	4.8	7.3
Arousal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	1
	3	12	12	12	11	17	12	12	16
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	N	10	10	9	11	17	12	11	15
	P	2	2	3	0	0	0	1	2

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 5)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: Dose (mg/kg):	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17
Open field observations	(Criteria)								
Defecation	N	10	12	10	8	17	12	11	16
	P	2	0	2	3	0	0	1	1
Posture, body position	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	11	17	12	12	16
	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Gait	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 5)

Items	Sex:	Male				Female			
		1, 3-BAC							
Test Substance:	0	10	60	300	0	10	60	300	
Dose (mg/kg):									
Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17	
Open field observations	(Criteria)								
Clonic convulsion	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypy	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 6)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC							
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17
Home cage observations	(Criteria)								
Tremor	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Hand-held observations									
Reactivity on removal from the cage	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	12	12	11	17	12	12	17
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 6)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17
Hand-held observations		(Criteria)							
Reactivity to handling	N	1	0	0	0	0	0	0	0
		2	12	12	12	11	17	12	12
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
Aggression	N		12	12	12	11	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Trauma	N		12	12	12	11	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Color of skin	N		12	12	12	11	17	12	12
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
Soiled fur	N		12	12	12	11	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	N		12	12	12	11	17	12	12
	P		0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	1		12	12	12	11	17	12	12
	2		0	0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0	0
	4		0	0	0	0	0	0	0
Color of conjunctiva	N		12	12	12	11	17	12	12
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
Secretion	N		12	12	12	11	17	12	12
	1		0	0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary

(Week 6)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: 1, 3-BAC	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
	Dose (mg/kg):	12	12	12	11	17	12	12	17
	Number of Animals:	(Criteria)							
Hand-held observations		N	12	12	12	11	17	12	12
Lacrimation		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
Salivation		N	12	12	12	11	17	12	12
Salivation		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection		N	12	12	12	11	17	12	12
Piloerection		P	0	0	0	0	0	0	0
Pupil size		N	12	12	12	11	17	12	12
Pupil size		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0
Open field observations									
Rearing		Mean	8.3	3.3	6.0	3.9	8.7	6.3	10.8
Rearing		S. D.	4.4	3.2	4.9	3.2	3.9	3.7	4.2
Arousal		1	0	0	0	0	0	0	0
Arousal		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	12	12	12	11	17	12	12
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Urination		N	12	12	11	10	15	12	10
Urination		P	0	0	1	1	2	0	2

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 6)

Items	Sex:	Male				Female			
	Test Substance:	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
	Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17
Open field observations									(Criteria)
Defecation	N	10	12	11	10	16	12	12	17
	P	2	0	1	1	1	0	0	0
Posture, body position	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Breathing	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Co-ordination movement	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Gait	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 7 Detailed Clinical Observations - Summary (Week 6)

Items	Sex:	Male				Female			
		Test Substance: Dose (mg/kg):	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60
	Number of Animals:	12	12	12	11	17	12	12	17
Open field observations									(Criteria)
Clonic convulsion	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tonic convulsion	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypy	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre behaviour	N	12	12	12	11	17	12	12	17
	P	0	0	0	0	0	0	0	0

See Annex 12.7 for details of criteria.

Table 8 Functional Tests - Summary

(Week 6)

Items	Sex:	Male					Female		
		Test Substance:	1, 3-BAC						
	Dose (mg/kg):	0	10	60	300	0	10	60	300
	Number of Animals:	5	5	5	5	5	5	5	5
Sensory reactivity to stimuli	(Criteria)								
Approach response		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	3	5	5	4	5	5	5
		3	2	0	0	1	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Touch response		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	4	5	5	0	4	4	5
		3	1	0	0	5	1	1	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Auditory response		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	5	5	5	5	5	5	5
		3	0	0	0	0	0	0	0
Tail pinch response		1	0	0	0	0	0	0	0
		2	5	4	5	3	5	5	5
		3	0	1	1	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0
Aerial righting reaction		1	5	5	5	5	5	5	5
		2	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0
Grip strength									
Forelimb grip strength	Mean (g)	1108.2	1227.8	1269.0	1309.0	1016.4	1068.2	1065.8	1086.4
	S. D.	192.4	134.7	243.1	44.3	106.6	110.9	54.7	135.7
Hindlimb grip strength	Mean (g)	784.4	827.0	835.4	869.6	697.2	644.0	700.0	609.2
	S. D.	16.9	115.6	105.3	66.8	42.1	69.4	73.1	147.5

See Annex 12.7 for details of criteria.

Significantly different from control : *, P<0.05 ; **, P<0.01

Table 9 Motor Activity - Summary

(Week 6)

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	Time: Unit:	0-10 min Count/10 min	10-20 min Count/10 min	20-30 min Count/10 min	30-40min Count/10 min	40-50min Count/10 min	50-60min Count/10 min	Total Count/1 hr
1, 3-BAC 0	Mean	2436.2	1739.2	659.0	274.4	36.8	7.0	5152.6
	S. D.	269.9	517.1	488.3	453.1	76.2	7.9	1284.3
	n	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 10	Mean	2549.0	1677.2	755.6	311.6	14.8	10.6	5318.8
	S. D.	322.6	762.7	742.2	248.3	22.1	9.0	1321.9
	n	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 60	Mean	2550.2	1714.2	943.6	188.4	36.8	34.4	5467.6
	S. D.	170.4	706.4	634.4	241.9	64.0	76.9	1691.4
	n	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 300	Mean	2255.2	1384.4	621.4	162.0	25.0	22.6	4470.6
	S. D.	270.0	604.7	701.9	153.9	21.2	25.4	1466.4
	n	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05 ; **, P<0.01

Table 10 Motor Activity - Summary

(Week 6)

Female

Test Substance Dose (mg/kg)	Time: Unit:	0-10 min Count/10 min	10-20 min Count/10 min	20-30 min Count/10 min	30-40min Count/10 min	40-50min Count/10 min	50-60min Count/10 min	Total Count/1 hr
1, 3-BAC 0	Mean	1549.6	647.8	889.4	587.4	515.4	343.8	4533.4
	S. D.	575.4	545.4	831.7	837.9	903.9	377.8	3532.9
	n	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 10	Mean	1899.4	1390.8	1018.8	969.2	1145.2	1293.6	7717.0
	S. D.	442.5	1228.5	1058.8	1317.7	1114.9	832.0	5581.8
	n	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 60	Mean	1845.6	994.2	985.0	813.2	499.2	909.2	6046.4
	S. D.	395.6	609.0	796.0	718.8	699.2	908.5	2322.0
	n	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 300	Mean	1548.8	618.8	533.0	691.0	747.8	1041.2	5175.6
	S. D.	662.8	650.4	905.6	1022.8	1003.2	943.3	3777.2
	n	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05 ; **, P<0.01

Table 11 Body Weight - Summary

Study No. B041798
Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	Male									
		1	8	15	22	29	36	42	43	50	56
1, 3-BAC 0	Mean	335.6	366.3	391.8	417.4	437.9	459.3	473.9	479.8	505.8	523.0
	S. D.	16.1	23.3	27.2	28.9	32.6	35.7	38.2	43.9	44.0	43.9
	n	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5
1, 3-BAC 10	Mean	333.6	364.9	390.2	413.2	435.2	455.5	474.5			
	S. D.	17.8	26.0	30.3	35.2	40.0	43.1	44.8			
	n	12	12	12	12	12	12	12			
1, 3-BAC 60	Mean	337.6	363.1	390.1	415.3	437.3	457.6	474.7			
	S. D.	18.2	24.8	33.3	38.0	41.5	47.9	50.3			
	n	12	12	12	12	12	12	12			
1, 3-BAC 300	Mean	337.2	355.6	374.6	386.6	407.4	422.5	434.2	446.0	471.0	489.8
	S. D.	17.5	25.9	26.1	32.4	30.6	30.8	31.6	27.6	30.6	28.3
	n	12	12	12	12	11	11	11	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 12 Body Weight - Summary

Study No. B041798
Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	Female		
		1	8	15
1, 3-BAC 0	Mean	220.2	237.5	256.1
	S. D.	9.6	10.7	14.0
	n	17	17	17
1, 3-BAC 10	Mean	218.2	232.5	247.4
	S. D.	8.1	11.3	13.8
	n	12	12	12
1, 3-BAC 60	Mean	219.0	236.3	253.9
	S. D.	9.1	12.0	17.8
	n	12	12	12
1, 3-BAC 300	Mean	220.7	237.7	255.1
	S. D.	8.0	10.8	16.1
	n	17	17	17

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 13

Study No. B041798

Body Weight (F0 Gestation) - Summary

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	0	7	14	20
1, 3-BAC 0	Mean	263.7	303.3	336.1	413.4
	S. D.	15.1	18.3	20.5	23.2
	n	12	12	12	12
1, 3-BAC 10	Mean	261.9	299.8	335.5	420.8
	S. D.	14.9	16.2	21.1	20.9
	n	12	12	12	12
1, 3-BAC 60	Mean	259.4	296.1	331.8	410.3
	S. D.	14.4	18.4	22.9	32.3
	n	12	12	12	12
1, 3-BAC 300	Mean	258.2	293.7	332.7	407.1
	S. D.	16.2	17.8	20.8	37.1
	n	11	11	11	11

Significantly different from control : * , P<0.05 ; ** , P<0.01.

639

Table 14

Study No. B041798

Body Weight (F0 Lactation) - Summary

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	0	4
1, 3-BAC 0	Mean S. D. n	313.9 26.2 12	335.3 21.0 12
1, 3-BAC 10	Mean S. D. n	311.6 28.3 12	336.3 22.8 12
1, 3-BAC 60	Mean S. D. n	309.5 29.5 12	326.5 26.0 12
1, 3-BAC 300	Mean S. D. n	301.2 37.0 11	329.1 16.1 11

340

Significantly different from control : * , P<0.05; ** , P<0.01.

Table 15

Body Weight - Summary

Female #

Study No. B041798
Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	22	29	36	42	43	50	56
1, 3-BAC 0	Mean	274.4	281.2	291.8	298.0	300.6	310.6	320.4
	S. D.	12.8	11.8	17.6	20.8	16.6	19.7	17.6
	n	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 300	Mean	270.8	279.8	286.6	293.8	297.8	296.8	316.4
	S. D.	14.8	19.1	17.6	18.9	25.1	19.5	27.1
	n	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.
#:Satellite animal

Table 16 Accumulative Body Weight Gain - Summary

Study No. B041798
Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	Male									
		1	8	15	22	29	36	42	43	50	56
1, 3-BAC 0	Mean	0.0	30.7	56.3	81.8	102.3	123.8	138.3	143.0	169.0	186.2
	S. D.	0.0	8.6	12.5	15.5	18.8	22.0	24.7	32.4	33.5	33.4
	n	12	12	12	12	12	12	12	5	5	5
1, 3-BAC 10	Mean	0.0	31.3	56.6	79.6	101.6	121.9	140.9			
	S. D.	0.0	10.0	14.2	19.9	24.5	27.3	28.6			
	n	12	12	12	12	12	12	12			
1, 3-BAC 60	Mean	0.0	25.5	52.5	77.7	99.7	120.0	137.1			
	S. D.	0.0	8.3	16.1	21.7	26.0	32.5	34.6			
	n	12	12	12	12	12	12	12			
1, 3-BAC 300	Mean	0.0	18.4*	37.4*	49.4**	73.2**	88.4**	100.0**	110.6	135.6	154.4
	S. D.	0.0	12.6	17.9	31.3	18.8	18.7	19.3	19.4	22.9	20.2
	n	12	12	12	12	11	11	11	5	5	5

Significantly different from control

*: P<0.05; **, P<0.01.

Table 17 Accumulative Body Weight Gain - Summary

Study No. B041798
Unit : g

Female

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	1	8	15
1, 3-BAC 0	Mean	0.0	17.2	35.8
	S. D.	0.0	5.9	8.7
	n	17	17	17
1, 3-BAC 10	Mean	0.0	14.3	29.3
	S. D.	0.0	7.1	12.2
	n	12	12	12
1, 3-BAC 60	Mean	0.0	17.3	34.9
	S. D.	0.0	6.9	11.5
	n	12	12	12
1, 3-BAC 300	Mean	0.0	17.0	34.4
	S. D.	0.0	6.2	11.1
	n	17	17	17

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 18

Study No. B041798

Body Weight Gain (F0 Gestation) - Summary
Base : Day 0 of Gestation

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	0	7	14	20
1, 3-BAC 0	Mean	0.0	39.6	72.4	149.8
	S. D.	0.0	5.4	9.7	11.6
	n	12	12	12	12
1, 3-BAC 10	Mean	0.0	37.8	73.6	158.8
	S. D.	0.0	10.2	15.3	21.2
	n	12	12	12	12
1, 3-BAC 60	Mean	0.0	36.7	72.3	150.9
	S. D.	0.0	7.5	12.9	23.2
	n	12	12	12	12
1, 3-BAC 300	Mean	0.0	35.5	74.5	148.9
	S. D.	0.0	8.8	12.5	31.3
	n	11	11	11	11

Significantly different from control : * , P<0.05 ; ** , P<0.01.

Table 19

Study No. B041798

Body Weight Gain (F0 Lactation) - Summary
Base : Day 0 of Lactation

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	0	4
1, 3-BAC 0	Mean	0.0	21.3
	S. D.	0.0	12.0
	n	12	12
1, 3-BAC 10	Mean	0.0	24.8
	S. D.	0.0	19.8
	n	12	12
1, 3-BAC 60	Mean	0.0	17.0
	S. D.	0.0	6.9
	n	12	12
1, 3-BAC 300	Mean	0.0	27.9
	S. D.	0.0	26.9
	n	11	11

Significantly different from control : * , P<0.05 ; ** , P<0.01.

Table 20

Accumulative Body Weight Gain - Summary

Study No. B041798
Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	Female #									
		1	8	15	22	29	36	42	43	50	56
1, 3-BAC 0	Mean	0.0	18.8	33.8	48.4	55.2	65.8	72.0	74.6	84.6	94.4
	S. D.	0.0	4.9	7.3	11.2	10.5	16.1	18.8	15.9	18.3	17.4
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 300	Mean	0.0	18.6	35.8	47.4	56.4	63.2	70.4	74.4	73.4	93.0
	S. D.	0.0	6.0	11.7	7.8	12.9	17.7	14.5	22.8	19.7	22.9
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

: Satellite animal

Table 21

Food Consumption - Summary

Study No. B041798
Unit : g/animal/day

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	Male						
		8	15	22	29	36	38	50
1, 3-BAC 0	Mean	26.53	26.68		27.19	28.00	28.88	28.58
	S. D.	2.62	2.62		2.27	2.57	2.94	2.47
	n	12	12		12	12	12	5
1, 3-BAC 10	Mean	26.50	26.78		27.60	28.02	29.46	
	S. D.	2.66	2.61		2.61	2.89	1.92	
	n	12	12		11	12	12	
1, 3-BAC 60	Mean	25.58	26.69		27.42	28.18	28.92	
	S. D.	2.60	3.19		2.67	3.17	2.54	
	n	12	12		12	12	12	
1, 3-BAC 300	Mean	24.31	25.22		25.88	26.87	27.55	30.28
	S. D.	2.96	3.21		1.98	2.27	3.08	1.63
	n	12	12		10	11	11	5

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 22

Food Consumption - Summary

Female

Study No. B041798
 Unit : g/animal/day

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	8	15
1, 3-BAC 0	Mean	20.65	21.39
	S. D.	1.82	1.98
	n	17	17
1, 3-BAC 10	Mean	19.17	20.01
	S. D.	1.56	1.23
	n	12	12
1, 3-BAC 60	Mean	20.15	20.01
	S. D.	2.10	2.49
	n	12	12
1, 3-BAC 300	Mean	19.59	20.09
	S. D.	1.42	1.93
	n	17	17

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 23

Study No. B041798

Food Consumption (F0 Gestation) - Summary

Unit : g/animal/day

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	7	14	20
1, 3-BAC 0	Mean	24.6	25.2	26.1
	S. D.	1.4	2.1	2.4
	n	12	12	12
1, 3-BAC 10	Mean	24.2	25.1	27.3
	S. D.	2.2	2.4	2.4
	n	12	12	12
1, 3-BAC 60	Mean	23.2	24.5	26.2
	S. D.	1.7	2.8	2.9
	n	12	12	12
1, 3-BAC 300	Mean	22.3*	24.8	25.4
	S. D.	2.0	1.8	5.8
	n	11	11	11

Significantly different from control : * , P<0.05; ** , P<0.01.

Table 24

Study No. B041798

Food Consumption (F0 Lactation) - Summary

Unit : g/animal/day

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	4
1, 3-BAC 0	Mean S. D. n	36.7 3.0 12
1, 3-BAC 10	Mean S. D. n	36.1 6.6 12
1, 3-BAC 60	Mean S. D. n	35.4 3.3 12
1, 3-BAC 300	Mean S. D. n	37.1 7.8 11

Significantly different from control : * , P<0.05 ; ** , P<0.01.

055

Study No. B041798
Unit : g/animal/day

Table 25 Food Consumption - Summary

Female [#]

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	22	29	36	42	50	56
1, 3-BAC 0	Mean	22.16	22.08	21.86	20.68	22.24	22.92
	S. D.	0.67	0.57	1.72	1.87	0.58	0.81
	n	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 300	Mean	20.70*	21.12	20.84	20.76	22.28	23.44
	S. D.	0.82	1.24	2.40	0.97	1.77	1.98
	n	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

#:Satellite animal

Table 26 Hematology - Summary

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	Red Blood Cell Count x10E6/ μ L		Hemoglobin conc. g/dL		Hematocrit %		MCV fL		MCH pg		MCHC %		Platelet Count x10E3/ μ L		Reticulocyte Ratio %		PT sec		
			Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	
1, 3-BAC 0	Mean	8.806	8.552	15.58	15.24	46.82	45.70	53.24	53.46	17.74	17.84	33.30	33.32	1057.0	935.2	2.38	2.34	23.52	22.86
	S. D.	0.317	0.104	0.36	0.59	1.38	1.45	1.99	2.11	0.56	0.79	0.37	0.58	84.8	65.8	0.25	0.36	1.91	4.66
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
1, 3-BAC 10	Mean	8.632		15.88		47.04		54.48		18.40		33.78		1056.0		2.48		27.34	
	S. D.	0.255		0.65		1.67		0.79		0.47		0.41		88.2		0.40		9.80	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 60	Mean	8.614		15.70		46.46		53.94		18.26		33.84		1065.4		2.44		22.34	
	S. D.	0.529		0.83		2.65		1.44		0.40		0.34		54.2		0.49		1.58	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 300	Mean	8.112	8.712	14.96	15.50	45.24	47.22	55.78	54.24	18.46	17.78	33.10	32.80	1055.4	1092.6*	3.44**	2.36	20.14	25.50
	S. D.	0.450	0.226	0.81	0.52	2.55	1.64	1.25	2.47	0.27	0.86	0.41	0.46	180.5	126.0	0.64	0.42	2.85	3.21
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

Significantly different from control

*: P<0.05; **, P<0.01.

Table 26 Hematology - Summary

Study No. B041798

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	APTT		
		Day 43	Day 57
1, 3-BAC	Mean	19.52	17.98
0	S. D.	2.05	3.16
	n	5	5
1, 3-BAC	Mean	20.30	
10	S. D.	2.59	
	n	5	
1, 3-BAC	Mean	19.10	
60	S. D.	2.04	
	n	5	
1, 3-BAC	Mean	18.72	20.20
300	S. D.	3.21	2.76
	n	5	5

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 26

Hematology - Summary

Study No. B041798

Male

Test Substance White Blood
 Dose (mg/kg) Cell Count
 x10E3/ μ L

Day 43 Day 57

1, 3-BAC	Mean	7.858	8.698
0	S. D.	1.148	1.325
	n	5	5
1, 3-BAC	Mean	8.962	
10	S. D.	1.597	
	n	5	
1, 3-BAC	Mean	9.556	
60	S. D.	2.996	
	n	5	
1, 3-BAC	Mean	10.714	9.672
300	S. D.	1.978	1.378
	n	5	5

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

45C

Table 26

Hematology - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Male												
	Lymphocyte		Neutrophilic Segmented		Neutrophilic Band		Eosinophil		Basophil		Monocyte		
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	
1, 3-BAC 0	Mean	93.40	86.54	4.60	11.66	0.00	0.00	0.20	0.40	0.00	0.00	1.80	1.40
	S. D.	2.41	2.92	1.67	3.24	0.00	0.00	0.45	0.55	0.00	0.00	1.64	0.55
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 10	Mean	89.18		9.42		0.00		0.80		0.00		0.60	
	S. D.	4.10		3.45		0.00		0.45		0.00		0.55	
	n	5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 60	Mean	89.80		8.60		0.00		0.20		0.00		1.40	
	S. D.	2.77		3.13		0.00		0.45		0.00		0.55	
	n	5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 300	Mean	88.20	88.10	10.40	7.48*	0.00	0.00	0.00	0.60	0.00	0.00	1.40	3.82
	S. D.	7.19	4.21	6.02	2.08	0.00	0.00	0.00	0.89	0.00	0.00	1.67	3.16
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *; P<0.05; **; P<0.01.

Table 27 Hematology - Summary

Female

Test Substance Dose (mg/kg)	Red Blood Cell Count x10E6/ μ L		Hemoglobin conc. g/dL		Hematocrit %		MCV fL		MCH pg		MCHC %		Platelet Count x10E3/ μ L		Reticulocyte Ratio %		PT sec		
			Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	
1, 3-BAC 0	Mean	7.040	8.178	13.38	15.44	40.24	45.46	57.20	55.62	19.00	18.88	33.20	33.94	1156.8	1065.2	5.74	2.54	18.20	15.70
	S. D.	0.341	0.403	0.42	0.61	0.99	1.59	2.39	1.37	0.92	0.40	0.35	0.38	89.4	115.0	0.66	0.85	1.00	0.29
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
1, 3-BAC 10	Mean	6.766		13.12		38.90		57.64		19.42		33.72		1225.0		8.28		17.92	
	S. D.	0.671		1.01		2.41		2.16		0.47		0.69		187.1		2.48		0.33	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 60	Mean	6.902		13.36		39.98		57.92		19.36		33.42		1105.0		5.88		18.12	
	S. D.	0.214		0.44		1.19		0.94		0.24		0.31		55.6		1.69		0.68	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 300	Mean	6.584	7.928	12.98	15.14	38.88	44.40	59.16	56.02	19.76	19.10	33.38	34.10	1360.8	1054.4	7.56	2.14	17.84	15.68
	S. D.	0.387	0.304	0.34	0.23	0.99	0.65	2.72	2.13	0.82	0.58	0.33	0.32	173.9	124.6	2.39	0.43	0.72	0.31
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 27

Hematology - Summary

Study No. B041798

Female

Test Substance Dose (mg/kg)	APTT		
		Day 43	Day 57
1, 3-BAC 0	Mean	13.76	14.40
	S. D.	1.34	1.56
	n	5	5
1, 3-BAC 10	Mean	13.22	
	S. D.	1.68	
	n	5	
1, 3-BAC 60	Mean	13.48	
	S. D.	0.61	
	n	5	
1, 3-BAC 300	Mean	13.36	14.92
	S. D.	2.16	1.32
	n	5	5

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

57

Table 27 Hematology - Summary

Female

Test Substance White Blood
 Dose (mg/kg) Cell Count
 x10E3/ μ L

Day 43 Day 57

1, 3-BAC	Mean	8.852	5.672
0	S. D.	2.934	1.263
	n	5	5
1, 3-BAC	Mean	9.856	
10	S. D.	2.225	
	n	5	
1, 3-BAC	Mean	8.304	
60	S. D.	1.388	
	n	5	
1, 3-BAC	Mean	9.782	4.152
300	S. D.	1.675	0.928
	n	5	5

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 27 Hematology - Summary

Female

Test Substance Dose (mg/kg)	Lymphocyte		Neutrophilic Segmented		Neutrophilic Band		Eosinophil		Basophil		Monocyte	
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
		Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43
1, 3-BAC 0	Mean	74.62	86.56	21.56	9.62	0.00	0.00	0.40	0.60	0.00	0.00	3.42
	S. D.	11.83	4.25	13.11	4.81	0.00	0.00	0.55	0.89	0.00	0.00	2.19
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 10	Mean	71.94		26.06		0.40		0.60		0.00		1.00
	S. D.	5.63		5.30		0.89		0.55		0.00		1.73
	n	5		5		5		5		5		5
1, 3-BAC 60	Mean	79.44		16.36		0.00		1.40		0.00		2.80
	S. D.	8.69		8.05		0.00		0.89		0.00		1.30
	n	5		5		5		5		5		5
1, 3-BAC 300	Mean	73.52	83.10	19.46	11.10	0.00	0.00	1.40	1.20	0.00	0.00	5.62
	S. D.	12.92	4.36	10.13	5.46	0.00	0.00	1.14	1.30	0.00	0.00	2.53
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 28

Blood Chemistry - Summary

Study No. B041798

Test Substance Dose (mg/kg)	Male																		
	ASAT (GOT) U/L		ALAT (GPT) U/L		γ GT U/L		ALP U/L		Total Bilirubin mg/dL		Urea Nitrogen mg/dL		Creatinine mg/dL		Glucose mg/dL		Total Cholesterol mg/dL		
	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57			
1, 3-BAC 0	Mean	109.8	107.2	33.8	30.6	2.2	0.8	348.2	326.8	0.10	0.10	14.66	14.40	0.28	0.30	123.6	122.6	61.8	70.8
	S. D.	22.6	16.1	9.0	3.4	0.4	0.8	49.9	75.1	0.00	0.00	2.95	0.74	0.04	0.00	5.0	14.9	7.4	7.4
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 10	Mean	90.8		26.4		1.6		369.2		0.10		15.38		0.26		146.8**		61.2	
	S. D.	16.3		4.7		0.5		40.9		0.00		0.93		0.05		12.0		13.7	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 60	Mean	95.4		28.4		1.8		386.8		0.10		14.86		0.28		132.6		68.0	
	S. D.	10.9		3.6		0.4		68.0		0.00		2.70		0.04		13.8		12.8	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 300	Mean	108.6	103.0	42.8	27.6	1.6	0.8	323.6	347.2	0.10	0.10	14.44	14.56	0.30	0.30	109.4	118.4	70.2	62.2
	S. D.	32.0	13.2	17.8	3.3	0.5	0.4	85.3	95.1	0.00	0.00	1.44	1.50	0.00	0.00	7.3	12.3	9.0	6.3
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

Significantly different from control

*: P<0.05; **, P<0.01.

Table 28 Blood Chemistry - Summary

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	Triglyceride		Total Protein		Albumin		A/G Ratio		Calcium		Inorganic Phosphorus		Na		K		Cl		
	mg/dL	g/dL	g/dL	g/dL	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	mg/dL	mg/dL	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	
1, 3-BAC	Mean	13.0	30.2	6.72	6.58	3.02	3.02	0.820	0.842	10.04	10.00	8.56	8.20	147.8	146.2	4.70	4.40	104.2	105.0
0	S. D.	6.3	14.6	0.26	0.13	0.19	0.16	0.066	0.064	0.18	0.19	0.40	0.57	0.8	1.1	0.19	0.12	0.8	1.2
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC	Mean	33.8*		6.56		3.04		0.854		10.20		8.30		147.6		4.54		104.8	
10	S. D.	7.5		0.42		0.24		0.036		0.32		0.38		0.5		0.23		1.5	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC	Mean	32.6		6.78		3.06		0.830		10.26		8.22		147.6		4.62		103.6	
60	S. D.	23.3		0.19		0.11		0.021		0.23		0.33		1.3		0.16		1.5	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC	Mean	24.2	28.6	5.98**	6.48	2.82	3.00	0.900	0.856	9.90	9.84	8.38	8.24	148.2	146.8	4.60	4.62	104.8	104.2
300	S. D.	7.0	5.7	0.18	0.13	0.16	0.16	0.086	0.054	0.21	0.11	0.70	0.43	0.4	1.3	0.19	0.22	1.8	2.2
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control

*: P<0.05; **, P<0.01.

Table 29

Blood Chemistry - Summary

Female

Test Substance Dose (mg/kg)	ASAT (GOT)		ALAT (GPT)		γ GT		ALP		Total Bilirubin		Urea Nitrogen		Creatinine		Glucose		Total Cholesterol		
	U/L		U/L		U/L		U/L		mg/dL		mg/dL		mg/dL		mg/dL		mg/dL		
		Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57
1, 3-BAC 0	Mean	143.8	126.2	45.2	21.2	1.2	1.2	260.8	151.4	0.10	0.10	17.76	17.00	0.34	0.42	122.8	123.4	60.4	73.0
	S. D.	25.1	18.0	8.1	3.7	0.8	1.3	81.8	19.4	0.00	0.00	2.47	4.43	0.05	0.04	11.9	19.7	5.0	4.6
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 10	Mean	151.2		52.6		2.0		221.4		0.06		20.66		0.36		116.8		69.8	
	S. D.	10.8		11.9		0.7		34.4		0.05		0.61		0.05		6.5		19.2	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 60	Mean	107.0*		44.6		2.0		240.6		0.10		18.84		0.40		139.2		53.8	
	S. D.	6.4		9.2		0.0		49.1		0.00		2.97		0.00		14.9		8.1	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 300	Mean	140.6	119.2	63.6*	29.8	1.8	1.0	358.6	197.0*	0.06	0.10	18.12	16.66	0.32	0.42	111.8	109.0	62.8	74.8
	S. D.	25.7	19.5	12.1	19.3	1.1	0.0	146.9	30.6	0.05	0.00	2.64	3.05	0.04	0.04	9.4	11.3	7.5	17.0
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

Significantly different from control

*: P<0.05; **: P<0.01.

Table 29

Blood Chemistry - Summary

Female

Test Substance Dose (mg/kg)	Triglyceride		Total Protein		Albumin		A/G Ratio		Calcium		Inorganic Phosphorus		Na		K		Cl		
	ng/dL		g/dL		g/dL				mg/dL		mg/dL		mmol/L		mmol/L		mmol/L		
		Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57	Day 43	Day 57
1, 3-BAC 0	Mean	62.2	13.0	6.80	7.26	3.14	3.50	0.862	0.936	11.04	10.08	10.02	6.54	145.8	145.4	4.56	4.30	102.2	104.0
	S. D.	39.7	4.1	0.39	0.60	0.21	0.37	0.063	0.052	0.13	0.61	0.70	0.87	0.8	1.5	0.30	0.37	0.4	2.0
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 10	Mean	49.4		6.98		3.18		0.836		11.22		10.00		145.0		4.70		101.6	
	S. D.	13.0		0.54		0.23		0.043		0.35		0.46		0.7		0.29		1.5	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 60	Mean	67.0		6.80		3.26		0.926		10.94		9.72		146.4		4.46		102.4	
	S. D.	8.0		0.10		0.11		0.027		0.38		0.48		0.5		0.09		0.9	
	n	5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 300	Mean	54.4	10.8	6.34	7.34	2.98	3.66	0.882	0.994	10.84	9.94	10.18	6.28	145.2	145.6	4.90	4.04	102.4	105.0
	S. D.	24.8	5.5	0.38	0.62	0.22	0.45	0.054	0.097	0.42	0.34	1.24	0.83	1.5	1.5	0.14	0.38	2.1	1.2
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 30 Urinalysis - Summary

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	pH								Protein			Glucose			Ketones			Bilirubin			Occult Blood												
	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	>9	-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+				
	Day 38								Day 38			Day 38			Day 38			Day 38			Day 38			Day 38									
1, 3-BAC 0	n	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	3	2	0	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0			
1, 3-BAC 10	n	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	4	1	0	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0
1, 3-BAC 60	n	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	4	1	0	5	0	0	0	0	0	0	4	1	0	5	0	0	0	5	0	0	0
1, 3-BAC 300	n	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	3	1	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 30 Urinalysis - Summary

Study No. B041798

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	Urobilinogen
	EU/dl
	0.1 1.0 2.0 4.0 >=8
Day 38	
1, 3-BAC 0	n 5 0 0 0 0
1, 3-BAC 10	n 5 0 0 0 0
1, 3-BAC 60	n 5 0 0 0 0
1, 3-BAC 300	n 5 0 0 0 0

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 31 Organ Weight - Summary

Male

Test Substance Dose (mg/kg)		Final Body Weight		Brain		Thymus		Heart		Liver		Spleen		Kidneys		Adrenals		Testes			
		g		g	Day 43	g	Day 43	mg	Day 43	g	Day 43	Day 57	g	Day 43	g	Day 43	mg	Day 43	g	Day 43	
					Day 43		Day 57		Day 43		Day 43	Day 57		Day 43		Day 57		Day 43		Day 57	
1, 3-BAC 0	Mean	446.0		489.6		2.084		2.054		340.0		261.4		1.572		1.542		10.672		12.154	
	S. D.	38.8		42.5		0.052		0.079		46.1		32.5		0.156		0.160		1.098		1.589	
	n	7		5		5		5		5		5		5		5		5		5	
1, 3-BAC 10	Mean	445.0				2.040				368.8				1.542				11.244		0.716	
	S. D.	43.5				0.092				108.2				0.228				1.242		0.121	
	n	12				5				5				5				5		5	
1, 3-BAC 60	Mean	444.8				2.010				334.2				1.580				11.138		0.698	
	S. D.	46.1				0.071				78.5				0.243				1.958		0.121	
	n	12				5				5				5				5		5	
1, 3-BAC 300	Mean	397.5		456.0		2.024		2.078		281.4		317.2		1.350		1.542		9.832		11.702	
	S. D.	35.0		29.7		0.074		0.028		35.9		65.8		0.230		0.239		1.026		0.789	
	n	6		5		5		5		5		5		5		5		5		5	

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 31 Organ Weight - Summary

Male

Test Substance Epididymides
Dose (mg/kg)

g
Day 43 Day 57

1, 3-BAC	Mean	1. 247	1. 352
0	S. D.	0. 051	0. 075
	n	7	5

1, 3-BAC	Mean	1. 248
10	S. D.	0. 072
	n	12

1, 3-BAC	Mean	1. 195
60	S. D.	0. 081
	n	12

1, 3-BAC	Mean	1. 058	1. 256
300	S. D.	0. 250	0. 116
	n	6	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 32

Study No. B041798

Organ Weight - Summary (F0 Delivered-on Weaning)
 Sex : Female

Test Substance	F. B. W. (g)	Brain (g)	Thymus (mg)	Heart (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Kidneys (g)	Adrenals (mg)
1, 3-BAC 0	Mean S. D. n	316.2 16.0 5	1.974 0.101 5	276.8 101.2 5	1.146 0.125 5	11.020 0.610 5	0.796 0.102 5	2.082 0.213 5
1, 3-BAC 10	Mean S. D. n	299.4 17.1 5	2.002 0.102 5	294.4 64.9 5	1.062 0.029 5	10.902 0.821 5	0.854 0.154 5	2.088 0.223 5
1, 3-BAC 60	Mean S. D. n	309.0 17.3 5	1.964 0.080 5	295.2 96.8 5	1.014 0.097 5	10.564 0.480 5	0.764 0.093 5	2.020 0.047 5
1, 3-BAC 300	Mean S. D. n	292.8 18.7 5	1.962 0.070 5	221.6 85.2 5	1.044 0.096 5	10.772 0.750 5	0.704 0.187 5	2.174 0.125 5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 33

Organ Weight - Summary

		Female #									
Test Substance Dose (mg/kg)	Final Body Weight g Day 57	Brain		Thymus		Heart		Liver	Spleen	Kidneys	Adrenals
		g	Day 57	mg	Day 57	g	Day 57	g	Day 57	g	Day 57
1, 3-BAC 0	Mean	296.0	1.908	301.8	1.012	7.824	0.578	1.920	74.58		
	S. D.	16.0	0.103	54.2	0.094	0.525	0.042	0.129	3.52		
	n	5	5	5	5	5	5	5	5		
1, 3-BAC 300	Mean	293.0	2.000	341.4	0.990	8.202	0.538	1.956	79.64		
	S. D.	23.6	0.096	90.1	0.072	0.490	0.043	0.205	10.97		
	n	5	5	5	5	5	5	5	5		

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

#:Satellite animal

Table 34 Relative Organ Weight - Summary

Test Substance Dose(mg/kg)		Male																				
		Final Body Weight		Brain		Thymus		Heart		Liver		Spleen		Kidneys		Adrenals		Testes				
		g		%	Day 43	Day 57	x10 ⁻³ %	Day 43	Day 57	%	Day 43	Day 57	%	Day 43	Day 57	%	Day 43	Day 57	x10 ⁻³ %	Day 43	Day 57	%
1, 3-BAC	0	Mean	446.0	489.6	0.486	0.422	79.44	53.34	0.366	0.318	2.464	2.478	0.170	0.164	0.660	0.604	13.10	12.66	0.754	0.682		
		S. D.	38.8	42.5	0.023	0.047	15.19	3.84	0.037	0.042	0.107	0.186	0.031	0.026	0.069	0.038	1.07	0.68	0.046	0.067		
		n	7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	5		
1, 3-BAC	10	Mean	445.0		0.474		87.40		0.354		2.596		0.164		0.638		13.28		0.746			
		S. D.	43.5		0.033		31.98		0.017		0.167		0.015		0.029		1.86		0.061			
		n	12		5		5		5		5		5		5		5		12			
1, 3-BAC	60	Mean	444.8		0.460		74.80		0.360		2.500		0.156		0.652		13.82		0.718			
		S. D.	46.1		0.065		11.53		0.052		0.157		0.005		0.086		1.23		0.085			
		n	12		5		5		5		5		5		5		5		12			
1, 3-BAC	300	Mean	397.5	456.0	0.514	0.456	71.76	69.98	0.342	0.338	2.480	2.568	0.188	0.178	0.696	0.626	17.84**	15.74**	0.705	0.686		
		S. D.	35.0	29.7	0.053	0.030	18.14	16.68	0.045	0.029	0.080	0.116	0.019	0.028	0.038	0.042	2.03	1.28	0.275	0.113		
		n	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5		

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 34 Relative Organ Weight - Summary

Study No. B041798

Male

Test Substance Dose (mg/kg)	Epididymides			
	%		Day 43	Day 57
1, 3-BAC 0	Mean	0.281	0.278	
	S. D.	0.027	0.015	
	n	7	5	
1, 3-BAC 10	Mean	0.281		
	S. D.	0.020		
	n	12		
1, 3-BAC 60	Mean	0.272		
	S. D.	0.031		
	n	12		
1, 3-BAC 300	Mean	0.270	0.278	
	S. D.	0.079	0.028	
	n	6	5	

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 35

Study No. B041798

Relative Organ Weight - Summary (F0 Delivered-on Weaning)
 Sex : Female

Unit : g/100gBW

Test Substance Dose (mg/kg)	F. B. W. (g)	Brain ($\times 10^{-3}$)	Thymus ($\times 10^{-3}$)	Heart	Liver	Spleen	Kidneys	Adrenals ($\times 10^{-3}$)
1, 3-BAC 0	Mean S. D. n	316.2 16.0 5	0.624 0.017 5	88.14 33.20 5	0.360 0.027 5	3.488 0.188 5	0.252 0.033 5	0.658 0.054 5
1, 3-BAC 10	Mean S. D. n	299.4 17.1 5	0.666 0.028 5	98.26 19.48 5	0.354 0.017 5	3.640 0.149 5	0.286 0.054 5	0.696 0.059 5
1, 3-BAC 60	Mean S. D. n	309.0 17.3 5	0.640 0.049 5	95.02 27.30 5	0.330 0.033 5	3.428 0.263 5	0.248 0.030 5	0.656 0.041 5
1, 3-BAC 300	Mean S. D. n	292.8 18.7 5	0.674 0.046 5	75.48 27.74 5	0.356 0.018 5	3.678 0.116 5	0.240 0.066 5	0.744* 0.021 5

Significantly different from control : * , P<0.05 ; ** , P<0.01.

372

Table 36

Relative Organ Weight - Summary

Study No. B041798

Test Substance Dose (mg/kg)	Final Body Weight g Day 57	Female #						
		Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidneys	Adrenals
		% Day 57	x10 ⁻³ % Day 57	x10 ⁻³ % Day 57				
1, 3-BAC 0	Mean	296.0	0.646	101.44	0.342	2.642	0.196	0.650
	S. D.	16.0	0.034	13.09	0.019	0.085	0.022	0.032
	n	5	5	5	5	5	5	5
1, 3-BAC 300	Mean	293.0	0.686	115.42	0.338	2.804**	0.184	0.670
	S. D.	23.6	0.042	23.14	0.019	0.065	0.029	0.071
	n	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

#: Satellite animal

Table 37 Necropsy Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals Number of Animals Examined	Scheduled Sacrifice								
		Male		1, 3-BAC		1, 3-BAC		Female		
		1, 3-BAC	10	10	60	300	1, 3-BAC	10	1, 3-BAC	
		mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	
		7	12	12	6	12	12	12	11	
Stomach										
Adhesion, forestomach		0	0	0	0	0	0	0	1	
Thickening, forestomach, wall		0	0	0	6	0	0	0	11	
Ulcer, forestomach, mucosa		0	0	0	0	0	0	0	1	
Liver										
Whitish patch		0	0	0	0	0	0	0	1	
Testis										
Small		0	0	0	2					
Epididymis										
Small		0	0	0	2					

Table 37 Necropsy Findings - Summary

Scheduled Sacrifice (Recovery)

Organ Findings	Sex	Male		Female	
	Test Substance	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC
	Dose	0	300	0	300
	Dose Unit	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
	Number of Animals	5	5	5	5
	Number of Animals Examined	<5>	<5>	<5>	<5>
Uterus Distention			1	0	

Table 37 Necropsy Findings - Summary

Organ Findings	Death	
	Sex	Male
	Test Substance	1, 3-BAC
	Dose	300
	Dose Unit	mg/kg
Number of Animals	1	
	Number of Animals Examined	<1>
Thymus		
Dark reddish change	1	
Spleen		
Small	1	
Lung (and bronchus)		
Dark reddish change	1	
Stomach		
Dark reddish change, glandular stomach, mucosa	1	
Small intestine, duodenum		
Abnormal contents	1	
Small intestine, jejunum		
Abnormal contents	1	
Small intestine, ileum		
Abnormal contents	1	
Dilatation	1	
Large intestine, cecum		
Dilatation	1	

376

Table 37 Necropsy Findings - Summary

Not pregnant

Organ Findings	Sex	Female
	Test Substance	1, 3-BAC
	Dose	300
	Dose Unit	mg/kg
	Number of Animals	1
	Number of Animals Examined	<1>
Stomach		
Thickening, forestomach, wall		1

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Scheduled Sacrifice							
		Male		Female		Male		Female	
		1, 3-BAC 0 mg/kg 7	1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12	1, 3-BAC 300 mg/kg 6	1, 3-BAC 0 mg/kg 12	1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12	1, 3-BAC 300 mg/kg 11
Grade		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Heart									
Degeneration, myocardial fiber		1 2			2 0				1 0
		2 0			0 0				0 0
		3 0			0 0				0 0
		4 0			0 0				0 0
Lymph node, mandibular		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Lymph node, mesenteric		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Thymus		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Spleen		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Extramedullary hematopoiesis, erythrocytic		1 0			0 0	5 0			5 0
		2 0			0 0				0 0
		3 0			0 0				0 0
		4 0			0 0				0 0
Bone marrow, femur		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Trachea		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Lung (and bronchus)		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Accumulation, macrophage		1 2			3 0	1 0			1 0
		2 0			0 0				0 0
		3 0			0 0				0 0
		4 0			0 0				0 0

◇, Number of animals examined

1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Scheduled Sacrifice							
		Male		Female		Male		Female	
		1, 3-BAC 0 mg/kg 7	1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12	1, 3-BAC 300 mg/kg 6	1, 3-BAC 0 mg/kg 12	1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12	1, 3-BAC 300 mg/kg 11
Lung (and bronchus)	Grade	<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Hemorrhage	1	3			2	3			2
	2	0			0	0			0
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0
Metaplasia, osseous	1	2			0	2			1
	2	0			0	0			0
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0
Mineralization, arterial wall	1	1			0	0			0
	2	0			0	0			0
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0
Stomach	<5>	<5>	<5>	<6>	<5>	<5>	<5>	<12>	
Cell infiltration, inflammatory, forestomach, focal	1	0	0	0	0	**	0	0	1
	2	0	0	0	6	0	0	0	9
	3	0	0	0	0	0	0	0	1
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Erosion, glandular stomach	1	0	1	0	0	1	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0

◇, Number of animals examined

1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Significantly different from control : **, P<0.01.

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Scheduled Sacrifice							
		Male		Female					
		1, 3-BAC 0 mg/kg 7	1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12	1, 3-BAC 300 mg/kg 6	1, 3-BAC 0 mg/kg 12	1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12	1, 3-BAC 300 mg/kg 11
Grade									
Stomach		<5>	<5>	<5>	<6>	<5>	<5>	<5>	<11>
Hyperkeratosis, forestomach, focal		1 0	0	0	6 **	0	0	0	11 **
	2 0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3 0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyperplasia, squamous, forestomach, focal		1 0	0	0	0 **	0	0	0	0 **
	2 0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3 0	0	0	0	6	0	0	0	10
	4 0	0	0	0	0	0	0	0	1
Ulcer, forestomach		1 0	0	0	2 *	0	0	0	2 **
	2 0	0	0	0	3	0	0	0	6
	3 0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 0	0	0	0	0	0	0	0	1
Small intestine, duodenum		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Small intestine, jejunum		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Small intestine, ileum		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Large intestine, cecum		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Large intestine, colon		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Large intestine, rectum		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>

◇, Number of animals examined

1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Significantly different from control : * P<0.05; ** P<0.01.

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Scheduled Sacrifice							
		Male		Female					
		1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
Grade		7	12	12	6	12	12	12	11
Liver		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<6>
Cell infiltration, inflammatory, focal	1	2			3	1			2
	2	0			0	0			0
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0
Granulomatous inflammation, focal	1	0			0	0			0
	2	0			0	0			1
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0
Necrosis, hepatocyte, focal	1	1			0	0			0
	2	0			0	0			0
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0
Kidney		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Basophilic tubule, proximal tubule	1	1			0	2			0
	2	0			0	0			0
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0
Cast, hyaline	1	2			0	0			0
	2	0			0	0			0
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0

◇, Number of animals examined

1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male 1, 3-BAC 0 mg/kg 7	Scheduled Sacrifice					
			1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12	1, 3-BAC 300 mg/kg 6	Female 1, 3-BAC 0 mg/kg 12	1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12
			Grade	<5>	<0>	<0>	<5>	<0>
Kidney				<5>	<0>	<0>	<5>	<5>
Cell infiltration, lymphocyte, interstitium		1	1			2	1	0
		2	0			0	0	0
		3	0			0	0	0
		4	0			0	0	0
Mineralization, medulla		1	2			1	2	1
		2	0			0	0	0
		3	0			0	0	0
		4	0			0	0	0
Urinary bladder			<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<5>
Testis			<5>	<5>	<5>	<5>		
Atrophy, seminiferous tubule		1	0	2	0	2	*	
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	1		
		4	0	0	0	1		
Hyperplasia, interstitial cell, diffuse		1	0	0	0	1		
		2	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0		
		4	0	0	0	0		

◇, Number of animals examined

1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Significantly different from control : *, P<0.05.

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male 1, 3-BAC 0 mg/kg 7	Scheduled Sacrifice					
			1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12	1, 3-BAC 300 mg/kg 6	Female 1, 3-BAC 0 mg/kg 12	1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12
			Grade	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Epididymis								
Atrophy, duct			1	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	1	
			3	0	0	0	0	
			4	0	0	0	0	
Cell debris, duct			1	0	0	0	2	
			2	0	0	0	0	
			3	0	0	0	0	
			4	0	0	0	0	
Decrease, sperm, duct			1	0	0	0	0	
			2	0	0	0	0	
			3	0	0	0	0	
			4	0	0	0	2	
Seminal vesicle				<5>	<0>	<0>	<5>	
Prostate				<5>	<0>	<0>	<5>	
Cell infiltration, lymphocyte, interstitium			1	3		1		
			2	0		0		
			3	0		0		
			4	0		0		
Coagulating gland				<5>	<0>	<0>	<5>	
Ovary							<5>	<0>
								<5>

◇, Number of animals examined
1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Scheduled Sacrifice							
		Male		Female		Male		Female	
		1, 3-BAC 0 mg/kg 7	1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12	1, 3-BAC 300 mg/kg 6	1, 3-BAC 0 mg/kg 12	1, 3-BAC 10 mg/kg 12	1, 3-BAC 60 mg/kg 12	1, 3-BAC 300 mg/kg 11
Grade									
Uterus					<5>	<0>	<0>	<0>	<5>
Vagina					<5>	<0>	<0>	<0>	<5>
Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Aberrant craniopharyngeal tissue	1	0			1	0			0
	2	0			0	0			0
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0
Thyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Ectopic thymic tissue	1	0			1	0			0
	2	0			0	0			0
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0
Ultimobranchial remnant	1	4			4	5			3
	2	0			0	0			0
	3	0			0	0			0
	4	0			0	0			0
Parathyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Adrenal		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
Necrosis, fascicular zone, focal	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	1
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Scheduled Sacrifice							
		Male		Female					
		1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300	1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 10	1, 3-BAC 60	1, 3-BAC 300
Grade	mg/kg	7	12	12	6	12	12	12	11
Brain		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Spinal cord		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>
Sciatic nerve		<5>	<0>	<0>	<5>	<5>	<0>	<0>	<5>

◇ , Number of animals examined

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Scheduled Sacrifice (Recovery)			
		Male 1, 3-BAC 0 mg/kg 5	Female 1, 3-BAC 0 mg/kg 5	Male 1, 3-BAC 300 mg/kg 5	Female 1, 3-BAC 300 mg/kg 5
		Grade			
Stomach		<5>	<5>	<5>	<5>
Cell infiltration, inflammatory, forestomach, focal	1	0	3	0	2
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
Cyst, glandular stomach	1	1	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
Hyperplasia, squamous, forestomach, focal	1	0	5	0	5
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
Small intestine, duodenum		<5>	<5>	<5>	<5>
Small intestine, jejunum		<5>	<5>	<5>	<5>
Small intestine, ileum		<5>	<5>	<5>	<5>
Testis		<5>	<5>		
Atrophy, seminiferous tubule	1	0	0		
	2	0	0		
	3	0	1		
	4	0	0		

◇, Number of animals examined

1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Scheduled Sacrifice (Recovery)			
		Male 1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 300	Female 1, 3-BAC 0	1, 3-BAC 300
		mg/kg 5	mg/kg 5	mg/kg 5	mg/kg 5
		Grade	<5>	<5>	
	Epididymis				
	Uterus Dilatation, lumen			<1>	<0>
	1			1	
	2			0	
	3			0	
	4			0	
	Adrenal		<5>	<5>	<5>

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male 1, 3-BAC 300 mg/kg 1	Death
			Grade
Heart		<1>	
Lymph node, mandibular		<1>	
Thymus Atrophy		<1>	
	1	0	
	2	1	
	3	0	
	4	0	
Spleen Atrophy		<1>	
	1	1	
	2	0	
	3	0	
	4	0	
Bone marrow, femur		<1>	
Lung (and bronchus) Congestion		<1>	
	1	1	
	2	0	
	3	0	
	4	0	
Edema		1 2 3 4	1 0 0 0

◇ , Number of animals examined
 1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Male 1, 3-BAC 300 mg/kg 1	Death
			Grade
Stomach		<1>	
Cell infiltration, inflammatory, forestomach, focal	1 2 3 4	0 1 0 0	
Hemorrhage, glandular stomach	1 2 3 4	1 0 0 0	
Hyperplasia, squamous, forestomach, focal	1 2 3 4	0 1 0 0	
Liver		<1>	
Kidney Cyst		<1>	
	1 2 3 4	1 0 0 0	
Urinary bladder		<1>	
Testis		<1>	

◇, Number of animals examined
1, Minimal; 2, Mild; 3, Moderate; 4, Severe

Table 38 Histological Findings - Summary

Organ Findings	Sex	Male	Death
	Test Substance	1, 3-BAC	
Dose	300		
Dose Unit	mg/kg		
Number of Animals	1		
Grade			
Epididymis	<1>		
Seminal vesicle	<1>		
Prostate	<1>		
Coagulating gland	<1>		
Pituitary	<1>		
Parathyroid	<1>		
Adrenal	<1>		
Brain	<1>		
Spinal cord	<1>		
Sciatic nerve	<1>		

◇ , Number of animals examined

068
00

Table 38 Histological Findings - Summary

Not pregnant

Organ Findings	Sex Test Substance Dose Dose Unit Number of Animals	Female 1, 3-BAC 300 mg/kg 1	Grade
Stomach		<1>	
Cell infiltration, inflammatory, forestomach, focal	1 2 3 4	0 1 0 0	
Hyperkeratosis, forestomach, focal	1 2 3 4	1 0 0 0	
Hyperplasia, squamous, forestomach, focal	1 2 3 4	0 0 1 0	
Ulcer, forestomach	1 2 3 4	1 0 0 0	
Ovary		<1>	

◇ , Number of animals examined

1 , Minimal; 2 , Mild; 3 , Moderate; 4 , Severe

361

Table 39

Study No. B041798

Reproductive Performance (F0) - Summary
Mating Stage : 1st

392

Test Substance Dose (mg/kg)	Number of Pairs	Mean Estrus Cycle	Incidence of Females with Irregular Estrus Cycle	Mating Period			Copulation Index (%)	Fertility Index (%)
				Number of Estrus	Day of Conceiving			
1, 3-BAC M 0 F 0	Mean S. D. n	4.00 0.00 12	0/12	0.0 0.0 12	2.3 1.4 12		100.0 a) (12/12)	100.0 b) (12/12)
1, 3-BAC M 10 F 10	Mean S. D. n	4.17 0.39 12	0/12	0.0 0.0 12	3.5 2.6 12		100.0 (12/12)	100.0 (12/12)
1, 3-BAC M 60 F 60	Mean S. D. n	4.00 0.00 12	0/12	0.0 0.0 12	2.3 1.1 12		100.0 (12/12)	100.0 (12/12)
1, 3-BAC M 300 F 300	Mean S. D. n	4.09 0.20 11	1/12	0.1 0.3 12	3.8 3.4 12		100.0 (12/12)	91.7 (11/12)

a) : Number of copulated females / Number of pairs

b) : Number of pregnant females / Number of copulated females

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 40

Study No. B041798

Delivery Data (F0) - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Gestation Length (days)	Number of Corpora Lutea	Number of Implantation Sites	Total Number of Offspring	Implantation Index (%)	Delivery Index (%)	Gestation Index (%)
1, 3-BAC 0	Mean	22.4	17.7	15.8	14.6	89.92	92.53
	S. D.	0.5	1.5	1.5	1.1	8.03	7.59
	n	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 10	Mean	22.4	18.2	16.1	14.8	88.71	92.80
	S. D.	0.5	2.2	3.6	3.0	16.95	5.63
	n	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 60	Mean	22.5	16.8	15.3	14.1	91.71	92.36
	S. D.	0.5	2.5	1.7	1.7	6.87	4.88
	n	12	12	12	12	12	12
1, 3-BAC 300	Mean	22.5	16.9	15.8	14.8	93.48	93.72
	S. D.	0.5	1.7	1.8	1.9	4.14	6.78
	n	11	11	11	11	11	11

a) Number of pregnant animals delivered live offspring / number of pregnant animals
 Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 41

Study No. B041798

Litter Size and Viability Index (F1) - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Total Number of Offspring at Birth			Number of Live Offspring at Birth			Number of Live Offspring on Day 4			Number of Live Offspring on Day 5			Viability Index (%)		
							before Culling			after Culling					
	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total
1, 3-BAC 0	Mean	7.0	7.6	14.6	7.0	7.5	14.5	6.9	7.3	14.3				99.48	98.40
	S. D.	2.0	2.0	1.1	2.0	2.1	1.0	1.9	2.0	0.9				1.79	3.94
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12				12	12
1, 3-BAC 10	Mean	6.8	8.1	14.8	6.7	7.9	14.6	6.7	7.8	14.5				98.43	99.44
	S. D.	2.1	1.7	3.0	2.1	1.7	3.0	2.1	1.6	3.0				2.87	1.93
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12				12	12
1, 3-BAC 60	Mean	6.9	7.2	14.1	6.9	7.1	14.0	6.8	7.1	13.9				99.44	99.24
	S. D.	3.2	2.9	1.7	3.2	2.9	1.7	3.2	2.9	1.9				1.93	2.63
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12				12	12
1, 3-BAC 300	Mean	7.5	7.3	14.8	7.2	7.0	14.2	6.9	6.5	13.4				96.25	91.82
	S. D.	1.8	2.1	1.9	2.1	2.0	2.3	2.7	2.9	4.5				12.42	27.14
	n	11	11	11	11	11	11	11	11	11				11	11

Significantly different from control : *; P<0.05; **; P<0.01.

Table 42

Study No. B041798

Clinical Sign (F1 before Weaning) - Summary
Stage : Before Culling

Test Substance Dose (mg/kg)	/Findings (M/F)	Day	0	1	2	3	4
1, 3-BAC 0	Number of dams		12	12	12	12	12
	Number of offspring	84/91/0	84/90	84/90	84/89	84/88	
	Number of dams with abnormal offspring	0	0	0	0	0	0
	No Abnormality	84/90	84/90	84/89	84/88	83/88	
	Death (M/F/U)	0/1/0	0/0	0/1	0/1	0/1	1/0
1, 3-BAC 10	Number of dams		12	12	12	12	12
	Number of offspring	81/97/0	80/95	80/95	80/95	80/94	
	Number of dams with abnormal offspring	0	0	0	0	0	0
	No Abnormality	80/95	80/95	80/95	80/94	80/94	
	Death (M/F/U)	1/2/0	0/0	0/0	0/1	0/1	0/0
1, 3-BAC 60	Number of dams		12	12	12	12	12
	Number of offspring	83/86/0	83/85	82/85	82/85	82/85	
	Number of dams with abnormal offspring	0	0	0	0	0	0
	No Abnormality	83/85	82/85	82/85	82/85	82/85	
	Death (M/F/U)	0/1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
1, 3-BAC 300	Number of dams		11	11	11	11	11
	Number of offspring	83/80/0	79/77	76/71	76/71	76/71	
	Number of dams with abnormal offspring	1	0	0	0	0	0
	No Abnormality	76/75	76/71	76/71	76/71	76/71	
	Death (M/F/U)	4/3/0	3/6	0/0	0/0	0/0	0/0
Loss of suckling							

M:Male, F:Female, U:Unable to be sexed on day 0

665

Table 43

Study No. B041798

Body Weight of Offspring (F1 before Weaning) - Summary
 Sex : Male

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	before Culling / after Culling		Unit : g
		0	4	
1, 3-BAC 0	Mean	7.0	10.9	
	S. D.	0.4	0.7	
	n	12	12	
1, 3-BAC 10	Mean	6.8	11.2	
	S. D.	0.7	1.8	
	n	12	12	
1, 3-BAC 60	Mean	7.0	11.2	
	S. D.	0.4	0.8	
	n	12	12	
1, 3-BAC 300	Mean	6.8	10.7	
	S. D.	1.1	1.7	
	n	11	11	

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 43

Study No. B041798

Body Weight of Offspring (F1 before Weaning) - Summary
 Sex : Female

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	before Culling / Day	/ after Culling	
		0	4
1, 3-BAC 0	Mean	6.5	10.3
	S. D.	0.5	0.8
	n	12	12
1, 3-BAC 10	Mean	6.5	10.7
	S. D.	0.7	1.6
	n	12	12
1, 3-BAC 60	Mean	6.6	10.7
	S. D.	0.4	0.9
	n	12	12
1, 3-BAC 300	Mean	6.5	10.5
	S. D.	1.1	1.4
	n	11	10

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 44

Study No. B041798

Body Weight Gain of Offspring (F1 before Weaning) - Summary
 Sex : Male Base : Day 4 after Birth

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	Substance /Day	before Culling		after Culling
		0 -	4	
1, 3-BAC 0	Mean	3.9		
	S. D.	0.6		
	n	12		
1, 3-BAC 10	Mean	4.3		
	S. D.	1.1		
	n	12		
1, 3-BAC 60	Mean	4.2		
	S. D.	0.7		
	n	12		
1, 3-BAC 300	Mean	3.9		
	S. D.	0.8		
	n	11		

Significantly different from control

: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 44

Study No. B041798

Body Weight Gain of Offspring (F1 before Weaning) - Summary
 Sex : Female Base : Day 4 after Birth

Unit : g

Test Substance Dose (mg/kg)	/Day	before Culling		after Culling
		0 - 4		
1, 3-BAC 0	Mean	3.8		
	S. D.	0.5		
	n	12		
1, 3-BAC 10	Mean	4.2		
	S. D.	0.9		
	n	12		
1, 3-BAC 60	Mean	4.1		
	S. D.	0.7		
	n	12		
1, 3-BAC 300	Mean	3.9		
	S. D.	0.4		
	n	10		

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 45

Study No. B041798

External Examination of Offspring (F1) - Summary
 Day : 0 (Birth Day)

Test Substance	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC	1, 3-BAC
Dose (mg/kg)	0	10	60	300
Number of Dams	12	12	12	11
Number of Offspring	174	175	168	156
Number of Dams with Anomalous Offspring	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Number of Offspring with Any Anomalies	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 46

Study No. B041798

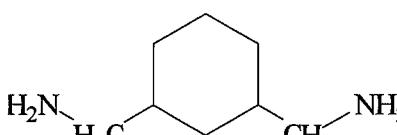
Necropsy Findings (F1 Offspring)
Test Substance : 1, 3-BAC

Test Substance Dose (mg/kg)	/Findings	Day:	Scheduled Sacrifice		Dead		Dead		Dead		Dead	
			4		M	F	M	F	M	F	M	F
1, 3-BAC 0	Number of offspring examined		83	88			1				1	1
	No abnormality		83	88			1				1	1
1, 3-BAC 10	Number of offspring examined		80	94			1	2				
	No abnormality		80	94			1	2			1	1
1, 3-BAC 60	Number of offspring examined		82	85								
	No abnormality		82	85								
1, 3-BAC 300	Number of offspring examined		76	71			4	3	1	3		
	No abnormality		76	71			4	3	1	3		

M:Male, F:Female

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	1, 3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン		
別 名	—		
C A S 番号	2579-20-6		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分 子 量	142.24		
試験に供した新規化学物質 の純度 (%)	99.98%		
試験に供した新規化学物質 のロット番号	50303		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸 気 圧	1866 Pa, 14 mmHg (120°C)		
対水溶解度	50 mg/mL で溶解		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融 点	-70°C 以下		
沸 点	244°C		
常温における性状	無色液体		
安 定 性	所定の取扱い、保管条件では安定		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	DMSO	50 mg/mL で溶解 ^{*1}	—
	水	50 mg/mL で溶解 ^{*1}	安定 ^{*2}
	アセトン	—	—
	生理食塩水	50 mg/mL で溶解 ^{*1}	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

^{*1} : 当研究所での溶媒検討の結果による。^{*2} : 被験物質溶液調製時に、発熱、発泡、変色は認められなかった。

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
TA100	カリフォルニア大学 ██████████	1983年5月27日
TA1535		
TA98		
TA1537		
WP2uvrA/pKM101	日本バイオアッセイ研究センター	1997年9月18日

3. S9 mix

(1) S9 の入手方法等 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	1. 自製 <input checked="" type="radio"/> 2. 購入 (製造元 : キッコーマン株式会社)
製造年月日	2005年2月25日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-517
保存温度	-85°C ~ -80°C

(2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	SD系ラット	名称	フェノバルビタール(PB), 5,6-ベンゾフラン(BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間 及び投与量 (g/kg 体重)	PB; 1日目: 0.03 2~4日目: 0.06 BF; PB投与3日目: 0.08
体重	210~249 g		

(3) S9 mix の組成

成分	S9 mix 1mL 中の量	成分	S9 mix 1mL 中の量
S9	0.1 mL	β-NADPH	4 μmol
MgCl ₂	8 μmol	β-NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
D-グルコース 6-リン酸	5 μmol	滅菌精製水	残量

4. 被験物質溶液の調製（被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。）

使用溶媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グレード	純度(%)
	注射用水	株式会社大塚製薬工場	K4C80	—	—
溶媒選択の理由	溶媒検討の結果、被験物質は 50 mg/mL で注射用水に溶解した。また、注射用水を加えた際に発熱、発泡、変色は認められなかった。この結果から、溶媒には注射用水を用いた。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="checkbox"/> 溶解 懸濁 その他（ ）				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法					
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	10 分～45 分 室温				
純度換算の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無				

5. 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントプロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Oxoid Nutrient Broth No.2	Oxoid 社	261002
前培養時間	8 時間		
培養容器（形状・容量）	L型試験管 22 mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	20 µL

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌 株 名	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
生菌数 (×10 ⁹ /mL)	予備試験	2.51	2.05	6.42	3.71
	本試験 1	2.53	2.03	5.99	3.40
	本試験 2	2.55	1.99	6.11	3.51
測 定 方 法 (いずれかを○で囲むこと)	1. O.D. 値よりの換算 2. 段階希釈法 <input checked="" type="checkbox"/> 3. 濁度よりの換算				

6. 最少グルコース寒天平板培地（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

自製・購入の別	1. 自製 2. 購入（製造元：オリエンタル酵母工業株式会社）
製造年月日	2005年3月5日 製造
購入の場合のLot No.	クリメディア AM-N 培地 ANI190CU
使用寒天の名称・ 製造元・Lot No.	名 称：伊那寒天 (BA-30A) 製造元：伊那食品工業株式会社 Lot No. : 40721

7. 試験の方法（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

(1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	1. プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他（ ）
その他の場合は その選定理由	

(2) 試験条件

組 成	菌懸濁液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液（直接法による場合）	0.5 mL
	S9 mix（代謝活性化法による場合）	0.5 mL
	トップアガー	2 mL
	その他（ ）	—
プレインキュベーション	温 度	37°C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37°C
	時 間	48 時間

8. コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル（目視）計測 2. 機器（自動コロニーカンター）計測
補正の有無	1. 無 2. 有（補正の方法：面積および数え落とし補正）

9. 試験の結果

(1) 試験結果は別表 1~3 および図 1-1~2-2 による。

(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)	陽 性	<input checked="" type="radio"/> 陰 性
判定の理由 <p>予備試験の結果に基づいて、菌の生育阻害の認められる用量を最高用量として本試験を2回実施した結果、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の2倍未満であった。</p> <p>以上の結果から、被験物質は本試験条件下において変異原性を有さない（陰性）と結論した。</p>		

(3) 参考事項

- ・予備試験を 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/プレートの7用量で実施した結果、S9 mix 非存在下では TA100, TA1535, TA98, TA1537 の 1250 µg/プレート以上の用量、WP2uvrA/pKM101 の 5000 µg/プレートの用量で、S9 mix 存在下ではすべての菌株の 1250 µg/プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた。また、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。なお、S9 mix 存在下の TA1535において、陰性（溶媒）対照値の2倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められた。
- 予備試験の結果から本試験は明らかな生育阻害を示す用量を最高用量として、S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250 µg/プレートの 6 用量、WP2uvrA/pKM101 は 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/プレートの 6 用量で、S9 mix 存在下の TA100, WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 は 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250 µg/プレートの 6 用量、TA1535 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250 µg/プレートの 8 用量で実施した。

- ・1 プレートを用いた予備試験における S9 mix 存在下の TA1535 において、陰性（溶媒）対照値の2倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められていたが、本試験では復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の2倍未満であり、2回の本試験で再現性が認められたことから、本復帰変異コロニー数の増加は偶発的なものであると判断した。
- ・S9 mix 非存在下および存在下のすべての菌株で菌の生育阻害が認められた。
- ・S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。
- ・試験結果には統計学的検定を実施しなかった。

別表 1

試験結果表（予備試験）

試験期間		2005年5月23日～2005年5月26日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	122	14	86	24	15
	1.22	110	18	81	17	10
	4.88	135	10	76	22	10
	19.5	132	17	90	16	14
	78.1	123	21	74	23	16
	313	119	14	85	22	10
	1250	101 *	12 *	91	11 *	15 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
S9 mix (+)	陰性対照	117	11	93	28	23
	1.22	134	18	112	32	28
	4.88	154	17	116	30	22
	19.5	146	19	119	22	23
	78.1	118	21	104	27	23
	313	153	32	104	29	19
	1250	127 *	9 *	104 *	29 *	18 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	577	548	616	768	298
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	1218	192	615	408	175

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。
陰性対照: 注射用水(DW)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃: アゾ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラゼン

別表2

試験結果表（本試験1）

試験期間		2005年6月14日～2005年6月17日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	101 119 (108) 104 (10)	14 11 (13) 13 (2)	92 88 (89) 88 (2)	24 15 (21) 24 (5)	16 11 (14) 15 (3)
	39.1	107 109 (113) 123 (9)	15 17 (15) 14 (2)		18 27 (22) 21 (5)	10 16 (15) 18 (4)
	78.1	101 115 (113) 122 (11)	10 11 (11) 11 (1)		22 26 (22) 19 (4)	19 17 (17) 15 (2)
	156	108 109 (110) 113 (3)	11 11 (11) 12 (1)	85 85 (84) 81 (2)	19 23 (20) 17 (3)	14 10 (12) 11 (2)
	313	119 131 (120) 110 (11)	10 9 (11) 15 (3)	76 84 (82) 87 (6)	18 23 (21) 21 (3)	14 16 (15) 14 (1)
	625	107 116 (119) 135 (14)	12 14 (12) 11 (2)	88 80 (81) 76 (6)	18 22 (21) 24 (3)	10 11 (11) 11 (1)
	1250	86 * 85 * (87) 91 * (3)	9 * 7 * (10) 14 * (4)	78 72 (74) 72 (3)	15 * 9 * (11) 10 * (3)	8 * 8 * (8) 7 * (1)
	2500			0 * 0 * (0) 0 * (0)		
	5000			0 * 0 * (0) 0 * (0)		
	陰性対照	125 134 (127) 123 (6)	14 10 (11) 9 (3)	95 89 (94) 99 (5)	30 29 (29) 27 (2)	20 17 (17) 14 (3)
S9 mix (+)	9.77	11 8 (10) 10 (2)				
	19.5	9 10 (10) 10 (1)				
	39.1	105 121 (119) 130 (13)	12 9 (10) 8 (2)	98 85 (97) 107 (11)	25 30 (26) 24 (3)	21 21 (19) 16 (3)
	78.1	133 113 (131) 148 (18)	10 13 (12) 13 (2)	103 112 (106) 103 (5)	24 23 (24) 24 (1)	19 14 (17) 19 (3)
	156	128 129 (133) 141 (7)	9 8 (9) 10 (1)	87 106 (98) 100 (10)	25 23 (24) 23 (1)	23 18 (21) 22 (3)
	313	119 121 (117) 112 (5)	11 11 (11) 10 (1)	98 89 (92) 89 (5)	26 21 (24) 24 (3)	18 15 (17) 18 (2)
	625	117 101 (116) 129 (14)	14 9 (11) 10 (3)	95 123 (114) 125 (17)	25 24 (24) 24 (1)	23 17 (19) 18 (3)
	1250	165 * 169 * (173) 186 * (11)	9 * 7 * (6) 3 * (3)	111 * 100 * (109) 117 * (9)	9 * 13 * (10) 9 * (2)	7 * 11 * (9) 10 * (2)
	陽性対照 S9 mix (-)	名称 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	AF-2 0.005	AF-2 0.1
		(コロニー数/プレート)	888 801 (853) 870 (46)	551 534 (557) 586 (27)	1138 1161 (1056) 870 (162)	825 897 (869) 886 (39)
	陽性対照 S9 mix (+)	名称 用量(μg/プレート)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 2	2-AA 0.5
		(コロニー数/プレート)	1377 1543 (1444) 1411 (88)	245 198 (231) 250 (29)	564 577 (560) 539 (19)	432 420 (425) 422 (6)

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)
(±標準偏差)

陰性対照: 注射用水(DW)

AF-2: 2-(2-ブリル)-3-(5-ニトロ-2-ブリル)アクリラミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

別表3

試験結果表（本試験2）

試験期間		2005年6月21日～2005年6月24日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)			フレームシフト型	
		塩基対置換型		WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
		TA100	TA1535			
S9 mix (-)	陰性対照	116 121 (122) 130 (7)	14 8 (11) 11 (3)	79 84 (85) 91 (6)	18 16 (17) 17 (1)	10 15 (12) 10 (3)
	39.1	136 103 (124) 132 (18)	8 10 (9) 10 (1)		24 15 (17) 13 (6)	10 10 (11) 14 (2)
	78.1	112 137 (128) 136 (14)	9 8 (9) 9 (1)		22 17 (19) 18 (3)	13 13 (14) 15 (1)
	156	138 164 (148) 142 (14)	7 10 (10) 14 (4)	74 77 (80) 90 (9)	18 24 (22) 24 (3)	12 13 (14) 16 (2)
	313	127 121 (129) 140 (10)	14 13 (14) 16 (2)	83 95 (87) 83 (7)	24 25 (22) 18 (4)	15 13 (13) 12 (2)
	625	132 115 (130) 142 (14)	10 10 (10) 10 (0)	80 77 (84) 94 (9)	25 24 (24) 24 (1)	15 16 (14) 12 (2)
	1250	92 * 58 * (77) 82 * (17)	7 * 10 * (7) 5 * (3)	89 61 (76) 77 (14)	11 * 13 * (12) 11 * (1)	5 * 4 * (4) 3 * (1)
	2500			0 * 0 * (0) 0 * (0)		
	5000			0 * 0 * (0) 0 * (0)		
	陰性対照	128 135 (135) 143 (8)	9 8 (11) 17 (5)	119 108 (111) 105 (7)	25 33 (28) 26 (4)	14 16 (16) 17 (2)
S9 mix (+)	9.77	12 14 (12) 10 (2)				
	19.5	15 11 (12) 9 (3)				
	39.1	132 138 (131) 124 (7)	13 9 (12) 15 (3)	99 125 (114) 118 (13)	21 34 (26) 24 (7)	18 16 (16) 14 (2)
	78.1	138 132 (130) 119 (10)	8 9 (11) 17 (5)	115 121 (114) 105 (8)	24 29 (27) 27 (3)	16 16 (16) 16 (0)
	156	120 127 (123) 121 (4)	9 10 (11) 14 (3)	129 123 (118) 103 (14)	27 24 (27) 29 (3)	15 14 (17) 21 (4)
	313	135 120 (131) 138 (10)	11 9 (13) 18 (5)	127 105 (116) 115 (11)	24 30 (29) 34 (5)	17 18 (17) 16 (1)
	625	126 119 (125) 129 (5)	13 12 (13) 15 (2)	145 114 (128) 126 (16)	26 31 (27) 24 (4)	15 16 (15) 13 (2)
	1250	108 * 93 * (115) 143 * (26)	13 * 6 * (8) 4 * (5)	120 * 166 * (136) 123 * (26)	14 * 12 * (12) 11 * (2)	9 * 10 * (9) 7 * (2)
	陽性対照 S9 mix (-)	名称 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	AF-2 0.005	AF-2 0.1
	(コロニー数/プレート)	744 640 (723) 785 (75)	590 601 (603) 618 (14)	1189 1102 (1108) 1032 (79)	931 959 (934) 913 (23)	434 341 (371) 337 (55)
	陽性対照 S9 mix (+)	名称 用量(μg/プレート)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 2	2-AA 2
	(コロニー数/プレート)	1461 1473 (1502) 1573 (61)	236 201 (241) 287 (43)	998 938 (966) 963 (30)	432 430 (435) 443 (7)	194 197 (189) 177 (11)

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。 (平均値)
(±標準偏差)

陰性対照: 注射用水(DW)

AF-2: 2-(2-ブリル)-3-(5-ニトロ-2-ブリル)アクリラミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

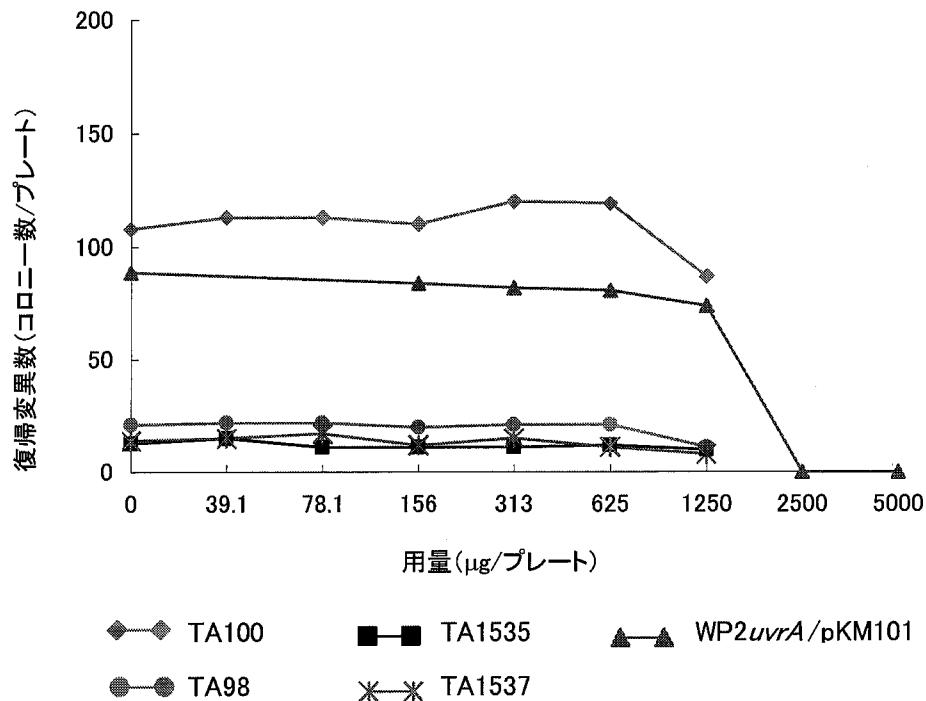


図 1-1 用量一反応曲線 (本試験 1; -S9 mix)

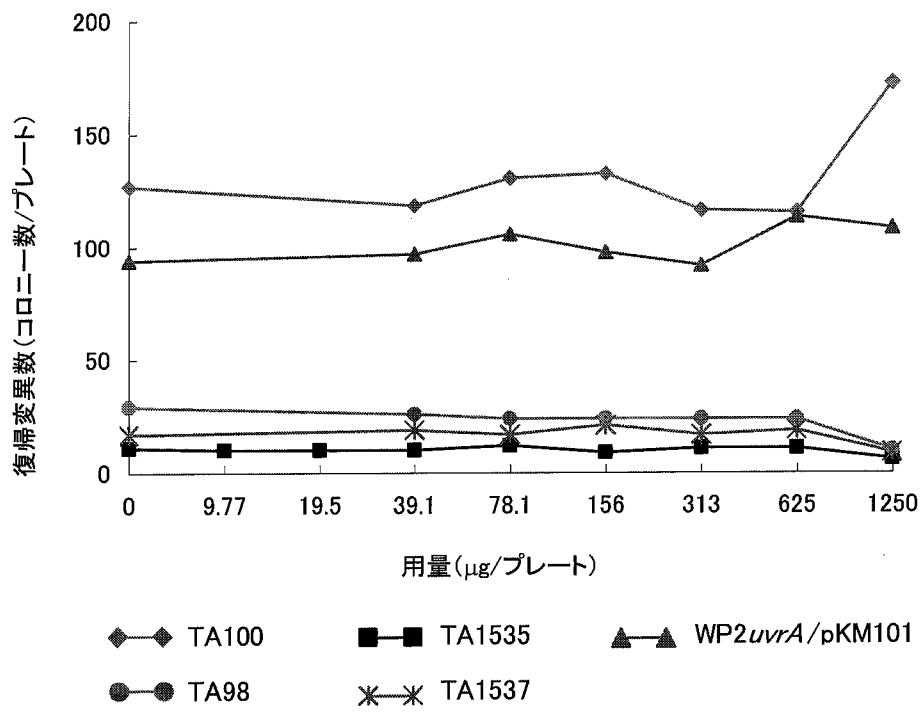


図 1-2 用量一反応曲線 (本試験 1; +S9 mix)

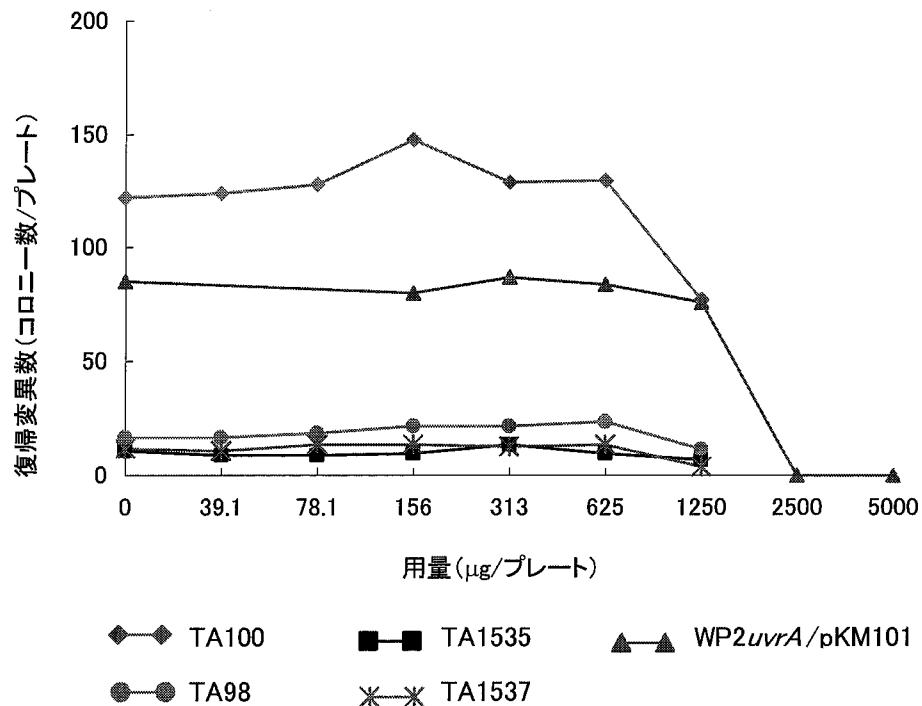


図 2-1 用量一反応曲線 (本試験 2; -S9 mix)

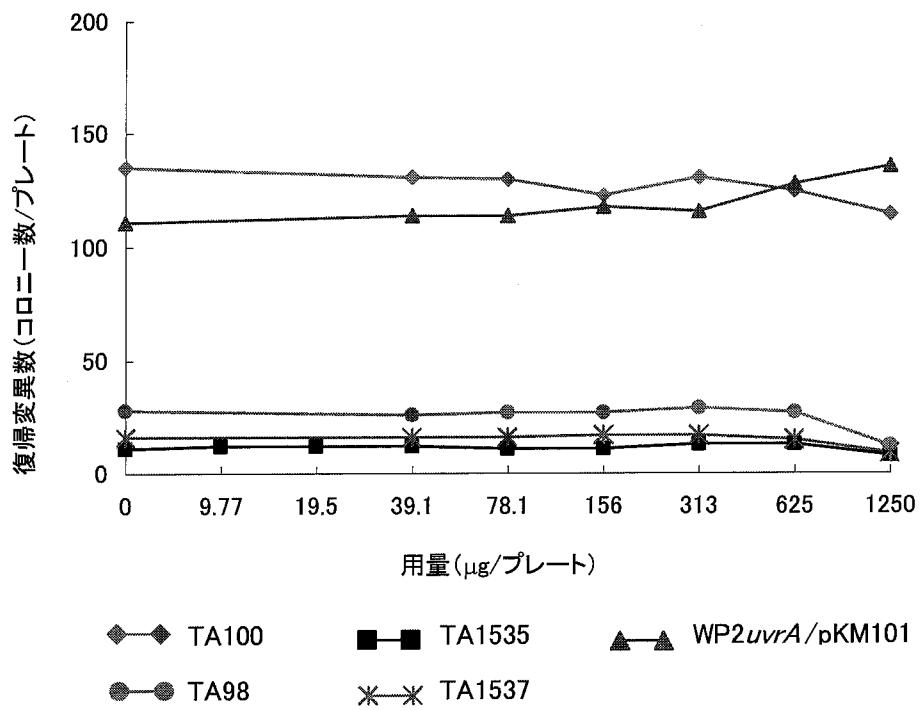


図 2-2 用量一反応曲線 (本試験 2; +S9 mix)

3. 試験実施概要

3.1 表題

1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンの細菌を用いる復帰突然変異試験

3.2 試験番号

B041799

3.3 試験目的

ネズミチフス菌株および大腸菌株を用いる復帰突然変異試験を実施し、1, 3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンの変異原性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

(1) 新規化学物質等に係る試験の方法について

（平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号 厚生労働省医薬食品局長、平成 15・11・13 製局第 2 号 経済産業省製造産業局長、環保企発第 031121002 号 環境省総合環境政策局長連名通知）

(2) OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No.471, 1997)

3.5 適用 GLP

(1) 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について

（厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 15 年 11 月 21 日）

(2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

3.6 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞ヶ関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県神栖市砂山 14 番地
(2005 年 7 月 31 日までは茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地)

5. 要約

ネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98 および TA1537 ならびに大腸菌株 WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験で 1, 3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンの変異原性を調べた。試験は S9 mix 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により実施した。

予備試験を 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/プレートの 7 用量で実施した結果、S9 mix 非存在下では TA100, TA1535, TA98, TA1537 の 1250 µg/プレート以上の用量、WP2uvrA/pKM101 の 5000 µg/プレートの用量で、S9 mix 存在下ではすべての菌株の 1250 µg/プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた。また、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。なお、S9 mix 存在下の TA1535 において、陰性（溶媒）対照値の 2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められた。

予備試験の結果から本試験は、S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250 µg/プレートの 6 用量、WP2uvrA/pKM101 は 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/プレートの 6 用量で、S9 mix 存在下の TA100, WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 は 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250 µg/プレートの 6 用量、TA1535 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250 µg/プレートの 8 用量で実施した。

2 回の本試験の結果、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった。また、S9 mix 非存在下では TA100, TA1535, TA98, TA1537 の 1250 µg/プレートの用量、WP2uvrA/pKM101 の 2500 µg/プレート以上の用量で、S9 mix 存在下ではすべての菌株の 1250 µg/プレートの用量で菌の生育阻害が認められた。なお、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

当該試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値は、当研究所の適正範囲内であった。また、陽性対照により誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍を超えて増加し、明らかな陽性結果を示した。従って、本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から、1, 3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンは本試験条件下において変異原性を有さないと結論した。

表1 試験結果表（予備試験）

試験期間		2005年5月23日～2005年5月26日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	122	14	86	24	15
	1.22	110	18	81	17	10
	4.88	135	10	76	22	10
	19.5	132	17	90	16	14
	78.1	123	21	74	23	16
	313	119	14	85	22	10
	1250	101 *	12 *	91	11 *	15 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
S9 mix (+)	陰性対照	117	11	93	28	23
	1.22	134	18	112	32	28
	4.88	154	17	116	30	22
	19.5	146	19	119	22	23
	78.1	118	21	104	27	23
	313	153	32	104	29	19
	1250	127 *	9 *	104 *	29 *	18 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	577	548	616	768	298
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	1218	192	615	408	175

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。
陰性対照: 注射用水(DW)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラゼン

表2 試験結果表（本試験1）

試験期間		2005年6月14日～2005年6月17日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	101 119 (108) 104 (10)	14 11 (13) 13 (2)	92 88 (89) 88 (2)	24 15 (21) 24 (5)	16 11 (14) 15 (3)
	39.1	107 109 (113) 123 (9)	15 17 (15) 14 (2)		18 27 (22) 21 (5)	10 16 (15) 18 (4)
	78.1	101 115 (113) 122 (11)	10 11 (11) 11 (1)		22 26 (22) 19 (4)	19 17 (17) 15 (2)
	156	108 109 (110) 113 (3)	11 11 (11) 12 (1)	85 85 (84) 81 (2)	19 23 (20) 17 (3)	14 10 (12) 11 (2)
	313	119 131 (120) 110 (11)	10 9 (11) 15 (3)	76 84 (82) 87 (6)	18 23 (21) 21 (3)	14 16 (15) 14 (1)
	625	107 116 (119) 135 (14)	12 14 (12) 11 (2)	88 80 (81) 76 (6)	18 22 (21) 24 (3)	10 11 (11) 11 (1)
	1250	86 * 85 * (87) 91 * (3)	9 * 7 * (10) 14 * (4)	78 72 (74) 72 (3)	15 * 9 * (11) 10 * (3)	8 * 8 * (8) 7 * (1)
	2500			0 *		
	5000			0 *		
				0 *		
S9 mix (+)	陰性対照	125 134 (127) 123 (6)	14 10 (11) 9 (3)	95 89 (94) 99 (5)	30 29 (29) 27 (2)	20 17 (17) 14 (3)
	9.77		11 8 (10) 10 (2)			
	19.5		9 10 (10) 10 (1)			
	39.1	105 121 (119) 130 (13)	12 9 (10) 8 (2)	98 85 (97) 107 (11)	25 30 (26) 24 (3)	21 21 (19) 16 (3)
	78.1	133 113 (131) 148 (18)	10 13 (12) 13 (2)	103 112 (106) 103 (5)	24 23 (24) 24 (1)	19 14 (17) 19 (3)
	156	128 129 (133) 141 (7)	9 8 (9) 10 (1)	87 106 (98) 100 (10)	25 23 (24) 23 (1)	23 18 (21) 22 (3)
	313	119 121 (117) 112 (5)	11 11 (11) 10 (1)	98 89 (92) 89 (5)	26 21 (24) 24 (3)	18 15 (17) 18 (2)
	625	117 101 (116) 129 (14)	14 9 (11) 10 (3)	95 123 (114) 125 (17)	25 24 (24) 24 (1)	23 17 (19) 18 (3)
	1250	165 * 169 * (173) 186 * (11)	9 * 7 * (6) 3 * (3)	111 * 100 * (109) 117 * (9)	9 * 13 * (10) 9 * (2)	7 * 11 * (9) 10 * (2)
	陽性対照 S9 mix (-)	名称 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	AF-2 0.005	AF-2 0.1
陽性対照 S9 mix (+)	(コロニー数/プレート)	888 801 (853) 870 (46)	551 534 (557) 586 (27)	1138 1161 (1056) 870 (162)	825 897 (869) 886 (39)	323 325 (330) 341 (10)
	名称 用量(μg/プレート)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 2	2-AA 0.5	2-AA 2
	(コロニー数/プレート)	1377 1543 (1444) 1411 (88)	245 198 (231) 250 (29)	564 577 (560) 539 (19)	432 420 (425) 422 (6)	216 191 (202) 199 (13)

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)
(±標準偏差)

陰性対照: 注射用水(DW)

AF-2: 2-(2-ブリル)-3-(5-ニトロ-2-ブリル)アクリルアミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表3 試験結果表（本試験2）

試験期間		2005年6月21日～2005年6月24日										
代謝活性化系の有無	被験物質用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)										
		塩基対置換型			フレームシフト型							
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537						
S9 mix (-)	陰性対照	116 121 130	(122) (7)	14 8 11	(11) (3)	79 84 91	(85) (6)	18 16 17	(17) (1)	10 15 10	(12) (3)	
	39.1	136 103 132	(124) (18)	8 10 10	(9) (1)			24 15 13	(17) (6)	10 10 14	(11) (2)	
	78.1	112 137 136	(128) (14)	9 8 9	(9) (1)			22 17 18	(19) (3)	13 13 15	(14) (1)	
	156	138 164 142	(148) (14)	7 10 14	(10) (4)		74 77 90	(80) (9)	18 24 24	(22) (3)	12 13 16	(14) (2)
	313	127 121 140	(129) (10)	14 13 16	(14) (2)		83 95 83	(87) (7)	24 25 18	(22) (4)	15 13 12	(13) (2)
	625	132 115 142	(130) (14)	10 10 10	(10) (0)		80 77 94	(84) (9)	25 24 24	(24) (1)	15 16 12	(14) (2)
	1250	92 * 58 * 82 *	(77) (17)	7 * 10 * 5 *	(7) (3)		89 61 77	(76) (14)	11 * 13 * 11 *	(12) (1)	5 * 4 * 3 *	(4) (1)
	2500						0 * 0 * 0 *	(0) (0)				
	5000						0 * 0 * 0 *	(0) (0)				
	陰性対照	128 135 143	(135) (8)	9 8 17	(11) (5)		119 108 105	(111) (111) (7)	25 33 26	(28) (4)	14 16 17	(16) (2)
S9 mix (+)	9.77			12 14 10	(12) (2)							
	19.5			15 11 9	(12) (3)							
	39.1	132 138 124	(131) (7)	13 9 15	(12) (3)		99 125 118	(114) (114) (13)	21 34 24	(26) (7)	18 16 14	(16) (2)
	78.1	138 132 119	(130) (10)	8 9 17	(11) (5)		115 121 105	(114) (114) (8)	24 29 27	(27) (3)	16 16 16	(16) (0)
	156	120 127 121	(123) (4)	9 10 14	(11) (3)		129 123 103	(118) (118) (14)	27 24 29	(27) (3)	15 14 21	(17) (4)
	313	135 120 138	(131) (10)	11 9 18	(13) (5)		127 105 115	(116) (116) (11)	24 30 34	(29) (5)	17 18 16	(17) (1)
	625	126 119 129	(125) (5)	13 12 15	(13) (2)		145 114 126	(128) (128) (16)	26 31 24	(27) (4)	15 16 13	(15) (2)
	1250	108 * 93 * 143 *	(115) (26)	13 * 6 * 4 *	(8) (5)		120 * 166 * 123 *	(136) (136) (26)	14 * 12 * 11 *	(12) (2)	9 * 10 * 7 *	(9) (2)
	陽性対照 S9 mix (-)	名称 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	AF-2 0.005	AF-2 0.1	AF-2 80					
	(コロニー数/プレート)	744 640 785	(723) (603) (75)	590 601 618	(603) (14)	1189 1102 1032	(1108) (79)	931 959 913	(934) (23)	434 341 337	(371) (55)	
	陽性対照 S9 mix (+)	名称 用量(μg/プレート)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 2	2-AA 0.5	2-AA 2					
	(コロニー数/プレート)	1461 1473 1573	(1502) (61)	236 201 287	(241) (43)	998 938 963	(966) (30)	432 430 443	(435) (7)	194 197 177	(189) (11)	

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)
(±標準偏差)

陰性対照: 注射用水(DW)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリラミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリシン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

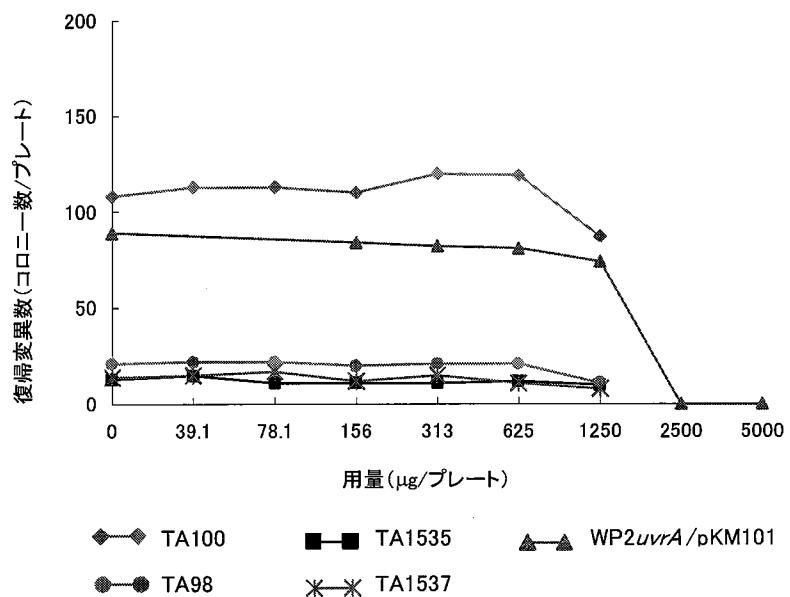


図 1-1 用量一反応曲線 (本試験 1; -S9 mix)

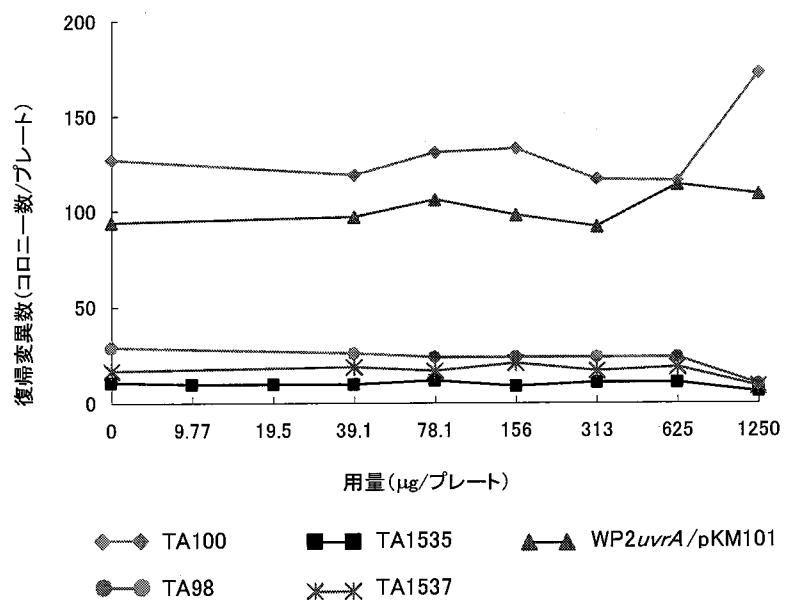


図 1-2 用量一反応曲線 (本試験 1; +S9 mix)

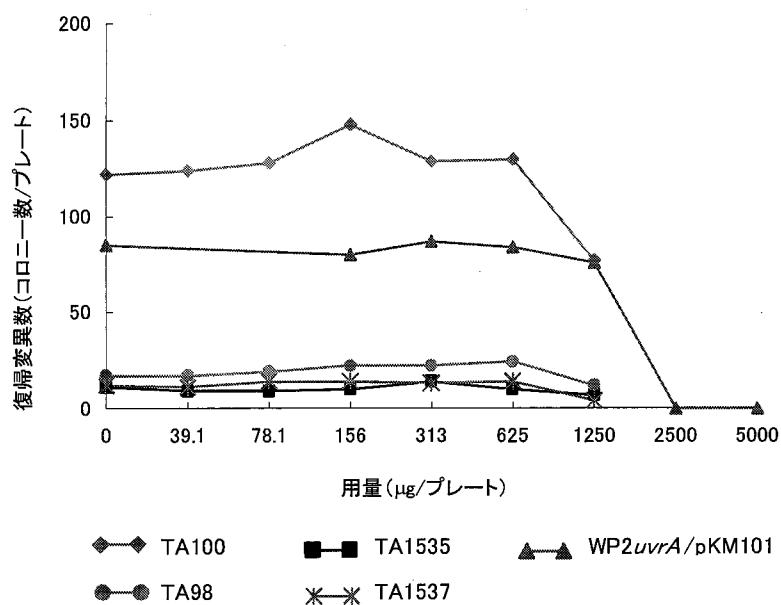


図 2-1 用量一反応曲線 (本試験 2; -S9 mix)

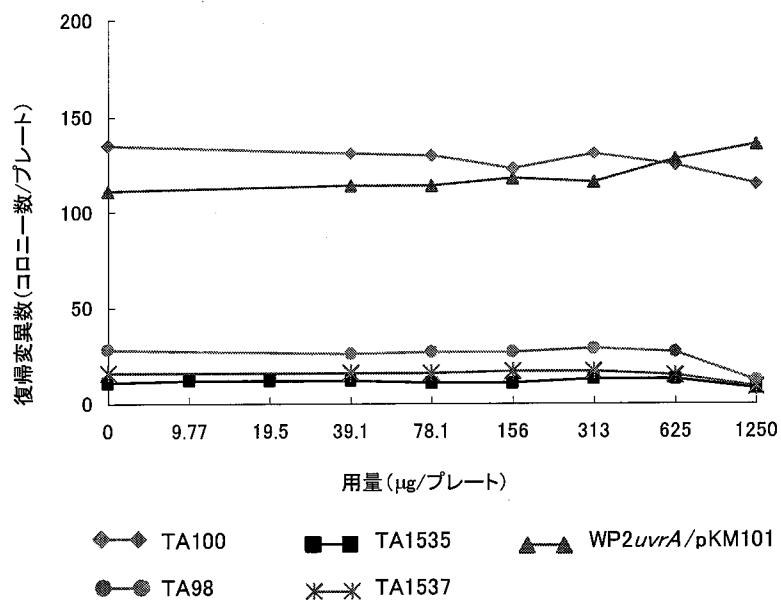
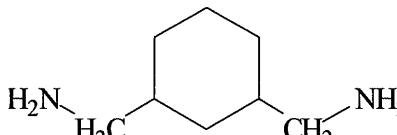


図 2-2 用量一反応曲線 (本試験 2; +S9 mix)

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン		
別 名	—		
CAS 番号	2579-20-6		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、 その製法の概要)			
分子量	142.24		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	99.98%		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	50303		
不純物の名称 及び含有率	—		
蒸 気 圧	1866 Pa, 14 mmHg (120°C)		
対水溶解度	—		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融 点	-70°C以下		
沸 点	244°C		
常温における性状	無色透明液体		
安 定 性	所定の取扱い、保管条件では安定		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	50 mg/mL で溶解 ^{*1}	安定 ^{*2}
	DMSO	50 mg/mL で溶解 ^{*1}	—
	生理食塩液	50 mg/mL で溶解 ^{*1}	安定 ^{*2}

DMSO : ジメチルスルホキシド

*1 : 試験施設で実施した溶媒検討の結果による。

*2 : 溶液の調製時に発熱、発泡、変色は認められなかった。

2. 細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	大日本製薬株式会社	
種	チャニーズハムスター	入手年月日	2003年9月2日	
培養液	イーグルMEM	製造元	日本製薬株式会社	
血清の種類と添加量	牛 10%	製造元 (Lot No.)	Invitrogen Corp. (444175)	
細胞周期	14.6 h	凍結条件	液体窒素中	
継代数	19~21*	培養条件	容器	
染色体数 (モード)	25本		温度	37 °C
			CO ₂ 濃度	5%
備考	*: 細胞入手時継代数: 14, 凍結細胞継代数: 17			

3. S9 mix

(1) S9 の入手方法等

自製・購入の別	1. 自製 <input checked="" type="radio"/> 2. 購入 (製造元 : キッコーマン株式会社)
製造年月日	2005年1月14日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-515
保存温度	-80°C以下 (実測値; -84~-82°C)

(2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	フェノバルビタール (PB), 5,6-ベンゾフラン (BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週令	7週	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	PB; 4日間 0.03-0.06 BF; 1日間 0.08
体重	206-239 g		

(3) S9 mix の組成

成分	S9 mix 1 mL 中の量	成分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.3 mL	β -NADP ⁺	4 μmol
MgCl ₂	5 μmol	NADPH	– μmol
KCl	33 μmol	HEPES 緩衝液 (pH7.2)	4 μmol
D-グロコース 6-リン酸	5 μmol	精製水	残量

(4) S9 mix の処理条件

1. プレート法	2. 細胞浮遊法	3. その他 ()
S9 量 (最終濃度)	5%	
S9 蛋白量 (最終濃度)	1.37 mg/mL	
処理時間	6 h	
回復時間	18 h	
備考		

4. 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	生理食塩液	株式会社 大塚製薬工場	K4E90	—	—
溶媒選択の理由	溶媒検討の結果、本被験物質は生理食塩液に 50 mg/mL で溶解し、溶液に発熱、発泡、変色は認められなかった。従って、本被験物質の溶媒（陰性対照物質）には生理食塩液を選択した。				
被験物質溶液 の性状	<input checked="" type="radio"/> 溶解 懸濁 その他 ()				
被験物質が難溶性 の場合における 懸濁等の方法	—				
溶液の調製から 使用までの 保存時間と温度	10 分～20 分 室温 : 細胞増殖抑制試験 10 分～30 分 室温 : 細胞増殖抑制試験-2 および 染色体異常試験（本試験）[同時調製] 5 分 室温 : 染色体異常試験（確認試験）				
純度換算の有無	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無				

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2005年5月13日から 2005年5月17日	2005年5月13日から 2005年5月17日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	2.7 mL／培養器	2.2 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2枚	2枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／mL	4×10^3 個／mL
	前培養日数*	3日間	3日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.3 mL／培養器	0.3 mL／培養器
	S9 mix 添加量		0.5 mL／培養器
	S9 の最終濃度		5%
	S9蛋白の最終濃度		1.37 mg/mL
	処理時間	6 h	6 h
	回復時間	18 h	18 h
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤で細胞を計数した。		
備考	* : 培養開始日を0日とした。		

(2) 細胞増殖抑制試験の結果

代謝活性化法によらない場合 (6-18 h)		代謝活性化法による場合 (6-18 h)	
用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)	用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100	0 (溶媒)	100
125	98	125	96
250	86	250	99
500	5	500	19
750	0	750	0
1000	0	1000	0
1250	0	1250	0
1500	0	1500	0

(3) 染色体異常試験（本試験）の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2005年5月20日から 2005年6月1日	2005年5月20日から 2005年6月1日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	2.7 mL／培養器	2.2 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／mL	4×10^3 個／mL
	前培養日数*	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.3 mL／培養器	0.3 mL／培養器
	S9 mix 添加量		0.5 mL／培養器
	S9 の最終濃度		5%
	S9 蛋白の最終濃度		1.37 mg/mL
	処理時間	6 h	6 h
	回復時間	18 h	18 h
備考	*: 培養開始日を 0 日とした。		

(4) 染色体異常試験（本試験）の結果（別表 1, 3 による。）

(5) 染色体異常試験（確認試験）の条件

		代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2005年6月10日から 2005年6月16日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm
	培 養 液 量	2.2 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／mL
	前培養日数*	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.3 mL／培養器
	S9 mix 添加量	0.5 mL／培養器
	S9 の 最 終 濃 度	5%
	S9 蛋白の最終濃度	1.37 mg/mL
	処理時間	6 h
	回復時間	18 h
備考	*: 培養開始日を 0 日とした。	

(6) 染色体異常試験（確認試験）の結果（別表 2, 4 による。）

6. 連続処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		(24-0 h) 処理による場合
試験実施期間		2005年5月13日から 2005年5月17日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm
	培 養 液 量	4.5 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／mL
	前培養日数*	3日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.5 mL／培養器
	処理時間	24 h
	回復時間	0 h
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤で細胞を計数した。	
備考	* : 培養開始日を 0 日とした。	

(2) 細胞増殖抑制試験の結果

(24-0 h) 処理による場合	
用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100
12.5	102
25	104
50	121
75	110
100	123
125	115
150	110
200	86

(3) 細胞増殖抑制試験-2 の条件

		(24-0 h) 処理による場合
試験実施期間		2005年5月20日から 2005年5月24日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm
	培 養 液 量	4.5 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個／mL
	前培養日数*	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.5 mL／培養器
	処理時間	24 h
	回復時間	0 h
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤で細胞を計数した。	
備考	* : 培養開始日を 0 日とした。	

(4) 細胞増殖抑制試験-2 の結果

(24-0 h) 処理による場合	
用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100
100	106
150	95
200	106
250	100
300	76
350	26
400	3
450	1
500	1

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定	陽 性	陰 性
判定の理由		
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法 —S9 mix 6-18 h 処理 0.56 mg/mL

(2) 参考事項

- 細胞増殖抑制試験に先立ち、予備試験を実施した。短時間処理法 S9 mix 非共存下（以下—S9 mix）および S9 mix 共存下（以下+S9 mix）ならびに連続処理法 24 時間処理（以下 24 時間処理）について、15, 150 µg/mL および 1500 µg/mL（約 10 mmol/L）を設定し、1 用量あたり 1 枚のプレートを用いて実施した。処理終了後のプレートを位相差倒立顕微鏡で観察し、陰性対照群プレートの細胞密度を 100% として相対的な細胞密度を判断した。その結果、各プレートの細胞密度は以下の通りであった。

処理条件	用量 (µg/mL)	15	150	1500
—S9 mix	100%	100%	0%	
+S9 mix	100%	100%	0%	
24 時間処理	100%	20%	0%	

この結果に基づき、細胞増殖抑制試験の用量は下記を設定した。

—S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/mL

+S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/mL

24 時間処理 : 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 µg/mL

- 細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制用量 (IC₅₀) は、—S9 mix で 297 µg/mL, +S9 mix で 353 µg/mL であった。一方、24 時間処理では 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかつたため、下記の用量を設定して細胞増殖抑制試験-2 を実施した。
- 24 時間処理 : 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL
- 細胞増殖抑制試験-2 の結果、IC₅₀ は 320 µg/mL であった。
- 短時間処理法について、IC₅₀に基づき、下記の用量を設定して染色体異常試験（本試験）を実施した。
- S9 mix : 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL
- +S9 mix : 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL

- ・本試験の結果、+S9 mix の 500 µg/mLにおいて、染色体構造異常細胞の出現頻度は 5.5%と疑陽性の範疇（5%以上 10%未満）であったため、染色体構造異常誘発の再現性を確認するために、下記の用量を設定して確認試験を実施した。

+S9 mix : 400, 450, 500 µg/mL

- ・構造異常は、以下の分類¹に従って観察した。

染色分体型切断

染色分体型交換

染色体型切断

染色体型交換 (二動原体、環状染色体など)

断片化

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。他の異常と区別して記録し、構造異常には含めなかった。

- ・数的異常は、動原体数が 35 以上の倍数体細胞（核内倍加細胞を含む）とした。

- ・染色体異常細胞は、下記の定義で集計した。

構造異常細胞：染色体構造異常を 1 個以上持つ細胞

数的異常細胞：染色体数的異常を持つ細胞

- ・被験物質の染色体異常誘発性の判定基準は下記の通りとした。

陰性：いずれの被験物質処理群においても、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が 5%未満である。

疑陽性：いずれかの被験物質処理群において、構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が 5%以上 10%未満である。

陽性：いずれかの被験物質処理群において、構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が 10%以上であり、用量依存的な増加傾向が認められる。

- ・統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

- ・確認試験の判定基準は下記の通りとした。

陰性：染色体異常誘発の再現性が認められない場合

陽性：染色体異常誘発の再現性が認められる場合

- ・確認試験の結果、いずれの被験物質用量においても、染色体構造異常細胞の出現頻度は 5%未満を示し、本試験で認められた構造異常誘発の再現性は認められなかった（判定：+S9 mix；陰性）。

- ・-S9 mix の 400, 450, 500 µg/mLにおいて染色体構造異常細胞の出現頻度は各々 8.5, 16.8, 16.5%を示し、陽性と判定されたが、これらの用量における細胞増殖率は各々 12, 7, 5%と低値であったことから、強い細胞毒性に副次的に起因して染色体異常が誘発された可能性も示唆された。

- ・本試験および確認試験の標本観察の結果、陰性対照群における染色体構造異常および数的異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件においても 5%未満であった。一方、陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件においても 10%以上であった。これらによって当試験は技術的に成立していることが示された。

- ・染色体異常試験において、1枚のプレートあたり500個、すなわち各用量あたり1000個の細胞について、分裂中期細胞を数え、下式により分裂指数（%）を算出した。
分裂指数（%）＝ 分裂中期細胞数／観察細胞数 ×100
またこれをもとに、各処理用量について、陰性対照値を100%として下式により相対分裂指数（%）を算出した。
相対分裂指数（%）＝ 被験物質処理群の分裂指数／陰性対照群の分裂指数 ×100
- ・本試験および確認試験の分裂指数測定の結果、細胞増殖率を指標とした場合に比べて顕著な分裂抑制が認められなかつたことから、被験物質の細胞周期に対する著しい影響は無いものと考えられた（別表1、2）。
- ・短時間処理法の結果、陽性と判定されたため、連続処理法については染色体異常試験を実施しなかつた。
- ・陽性対照物質に関する情報は以下の通りである。
マイトマイシンC（協和発酵工業株式会社、ロット番号435ADB、含量99%）
ベンゾ[a]ピレン（東京化成工業株式会社、ロット番号GG01、含量95.6%）
- ・参考文献
 - 1. 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会・第3分科会・遺伝毒性ワーキンググループ編「医薬品のための遺伝毒性試験Q&A」サイエンティスト社、東京、2000
 - 2. 祖父尼俊雄監修「染色体異常試験データ集・改訂1998年版」株式会社エル・アイ・シー、東京、1999

別表1 分裂指数測定結果（本試験）

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	相対分裂指数 (%)
陰性対照 (生理食塩液)	—	0	1000	49	4.9	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン	—	200	1000	37	3.7	76
	—	250	1000	50	5.0	102
	—	300	1000	45	4.5	92
	—	350	1000	40	4.0	82
	—	400	1000	13	1.3	27
	—	450	1000	7	0.7	14
	—	500	1000	20	2.0	41
陰性対照 (生理食塩液)	+	0	1000	85	8.5	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン	+	250	1000	94	9.4	111
	+	300	1000	97	9.7	114
	+	350	1000	90	9.0	106
	+	400	1000	47	4.7	55
	+	450	1000	39	3.9	46
	+	500	1000	34	3.4	40

別表2 分裂指数測定結果（確認試験）

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	相対分裂指数 (%)
陰性対照 (生理食塩液)	+	0	1000	95	9.5	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン	+	400	1000	104	10.4	109
	+	450	1000	76	7.6	80
	+	500	1000	50	5.0	53

別表 3 染色体異常試験の結果 (本試験)

被験物質の名称 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン

処理-回復 時間(h)	S9 mix:	被験物質の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)						ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数の異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 - 18	-	陰性対照 (生理食塩液)	100	1	0	0	0	0	1	0	99	100	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	101	100	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	200	100	0	0	0	0	0	0	0	95	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	92	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	250	100	0	0	0	0	0	0	0	87	100	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	92	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	89	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	300	100	0	0	0	0	0	0	0	84	100	0	0
			100	0	0	0	1	0	1	0	85	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	85	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	350	100	0	0	0	0	0	0	0	36	100	0	0
			100	0	1	1	0	0	2	0	42	100	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	39	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	400	100	0	6	0	0	0	6	0	10	100	0	0
			100	5	7	0	0	0	11	2	14	100	0	0
			200	5 (2.5)	13 (6.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (8.5)	2	12	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	450	82	6	10	0	1	0	16	0	8	82	2	0
			73	4	6	2	0	0	10	1	5	73	0	0
			155	10 (6.5)	16 (10.3)	2 (1.3)	1 (0.6)	0 (0.0)	26 (16.8)	1	7	155	2 (1.3)	0 (0.0)
6 - 18	-	500	100	4	12	0	0	0	15	1	5	100	0	0
			100	4	15	0	0	0	18	1	6	100	0	0
			200	8 (4.0)	27 (13.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	33 (16.5)	2	5	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	12	27	0	0	0	34	0	100	0	0	0
			100	13	32	0	0	0	43	1	100	0	0	0
			200	25 (12.5)	59 (29.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	77 (38.5)	1	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	陰性対照 (生理食塩液)	100	1	1	0	0	0	1	0	103	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	97	100	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	250	100	1	0	0	0	0	1	0	94	100	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	95	100	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	95	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	300	100	0	0	0	0	0	0	0	91	100	0	0
			100	1	2	0	1	0	3	0	94	100	0	0
			200	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	92	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	350	100	0	0	0	0	0	0	0	95	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1	98	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	97	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	400	100	0	0	0	0	0	0	0	77	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	84	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	80	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	450	100	2	1	0	0	0	3	2	45	100	1	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	46	100	0	0
			200	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	2	45	200	1 (0.5)	0 (0.0)
6 - 18	+	500	100	2	3	2	0	0	7	0	28	100	0	0
			100	2	2	1	0	0	4	0	25	100	0	0
			200	4 (2.0)	5 (2.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (5.5)	0	27	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	陽性対照 (BP20)	100	11	70	0	0	0	70	0	100	0	0	0
			100	24	77	0	0	0	78	0	100	0	0	0
			200	35 (17.5)	147 (73.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	148 (74.0)	0	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC : マイトマイシンC, BP : ベンゾ [a] ピレン

別表 4 染色体異常試験の結果（確認試験）

被験物質の名称 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン

処理-回復 時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)						ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 - 18	+	陰性対照 (生理食塩液)	100	0	0	1	0	0	1	0	97	100	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	103	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	400	100	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	85	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	87	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	450	100	0	0	0	0	0	0	0	56	100	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	59	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	57	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	500	100	1	3	0	0	0	3	0	28	100	0	0
			100	1	1	0	0	0	2	0	43	100	0	0
			200	2 (1.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0	36	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	+	陽性対照 (BP20)	100	4	79	0	0	0	79	0	100	0	0	0
			100	12	72	0	0	0	76	0	100	0	0	0
			200	16 (8.0)	151 (75.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	155 (77.5)	0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

BP : ベンゾ [a] ピレン

1933

B041800

図1 1,3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン
処理における細胞毒性（短時間処理法・-S9 mix）

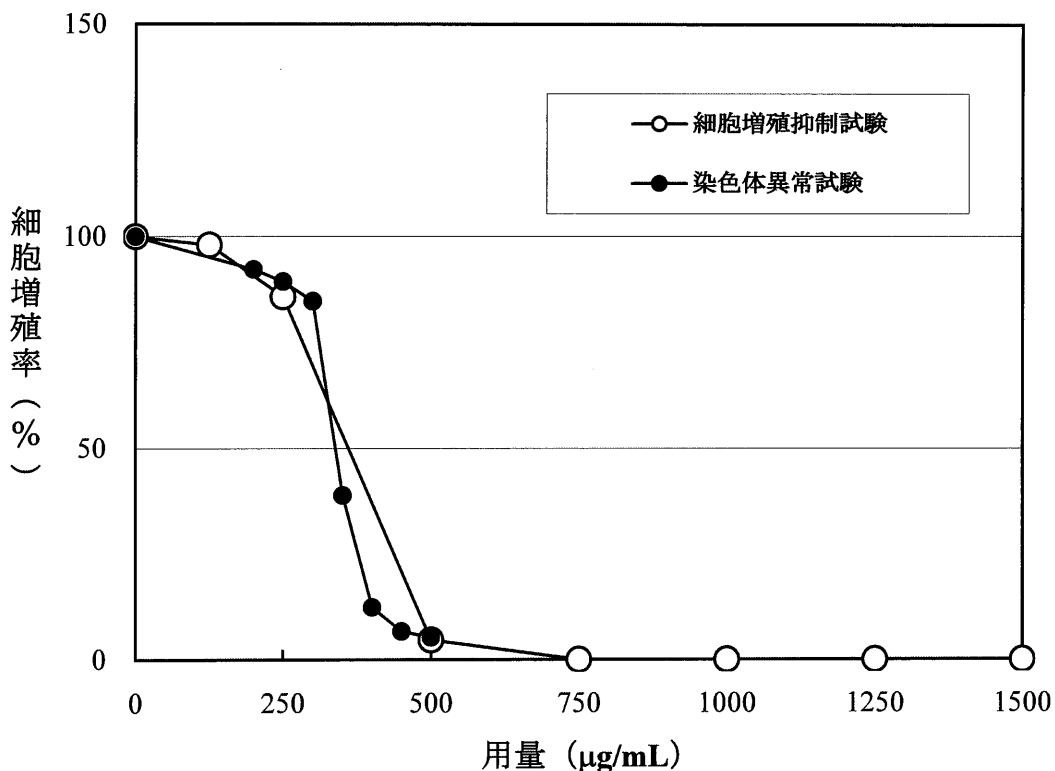


図2 1,3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン
処理における細胞毒性（短時間処理法・+S9 mix）

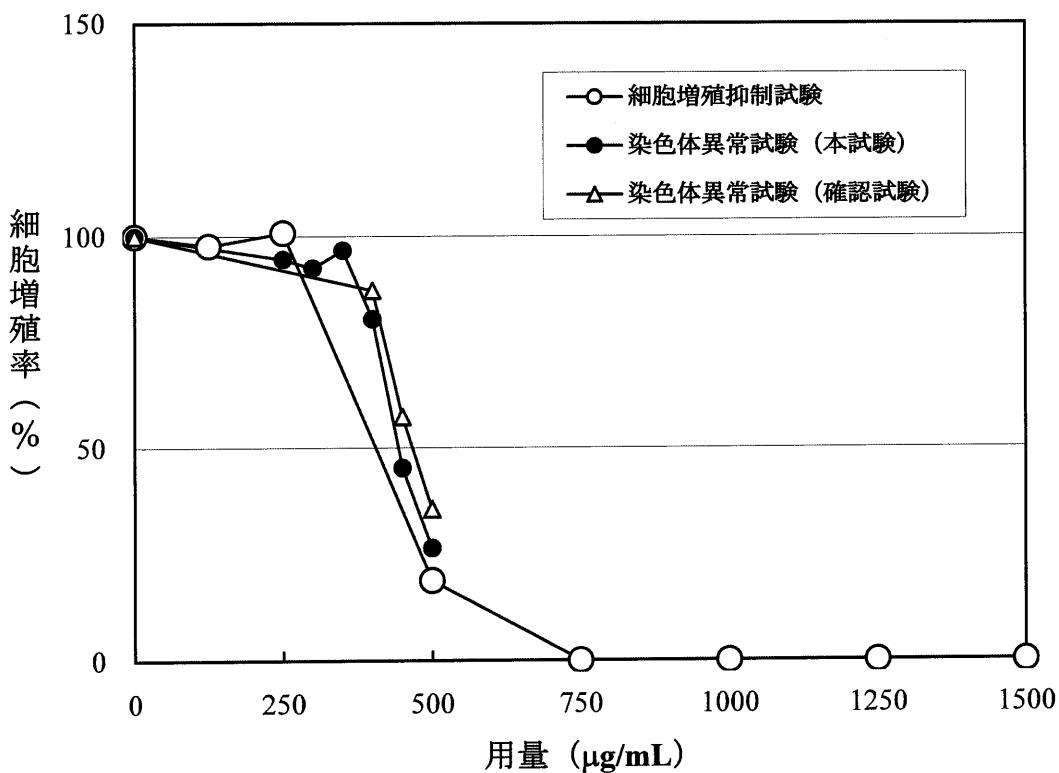


図3 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における細胞毒性(連続処理法)

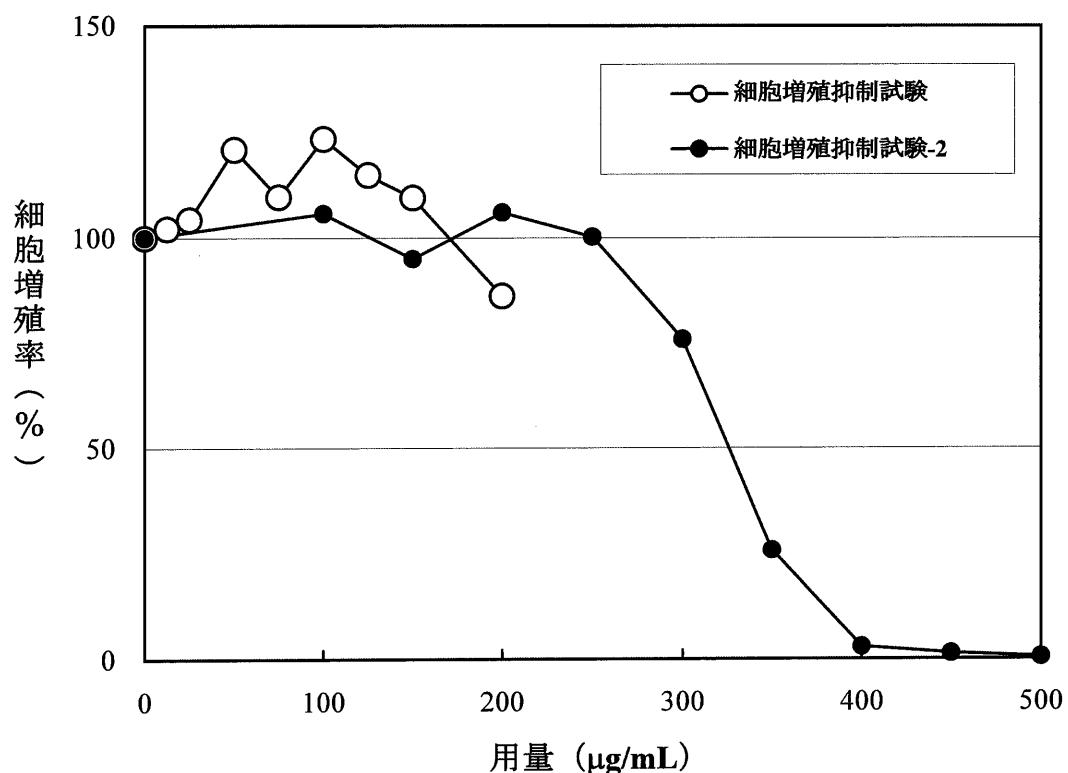


図4 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における構造異常細胞出現頻度

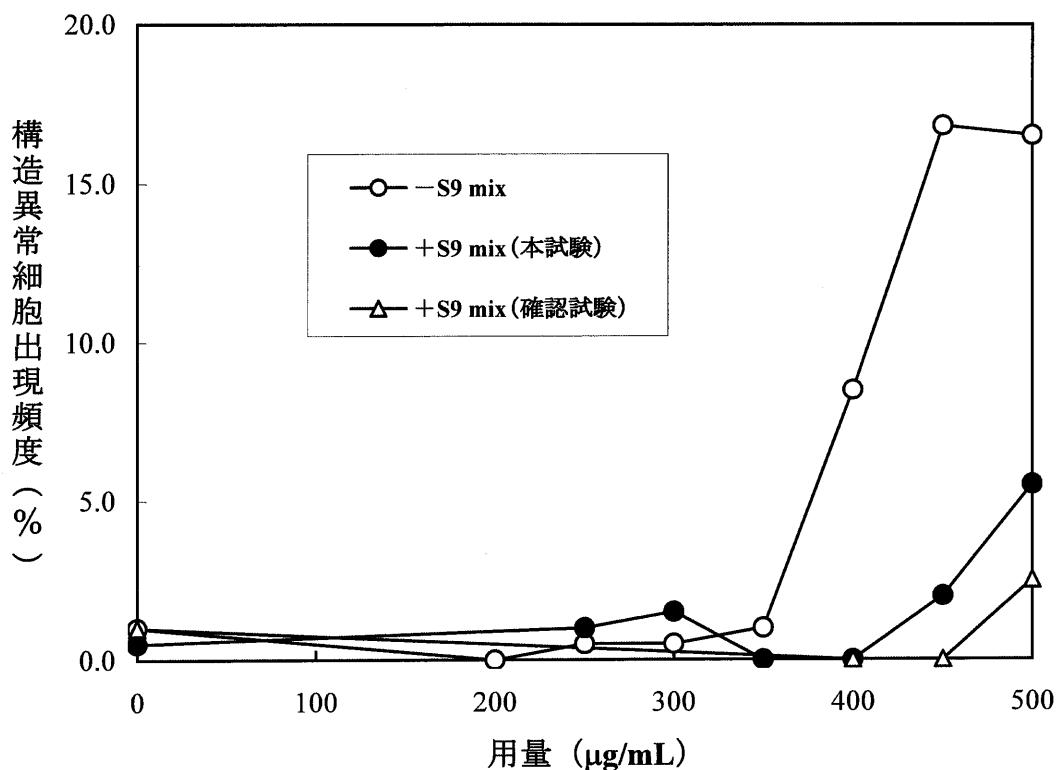
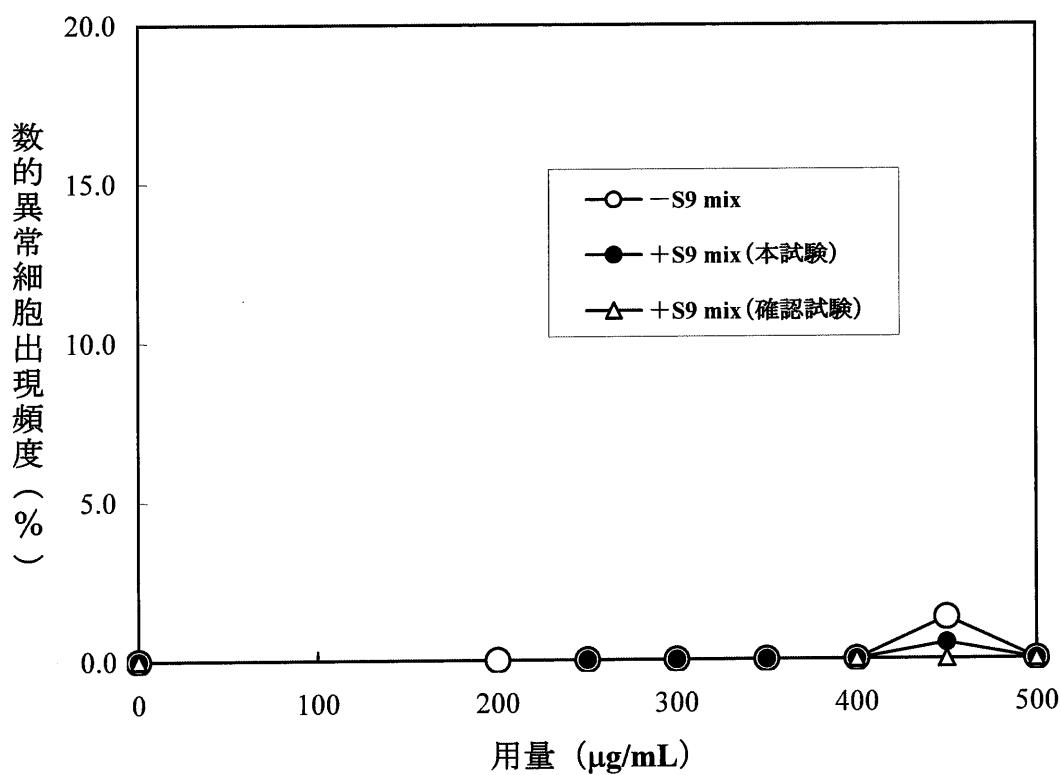


図5 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における数的異常細胞出現頻度



B041800

3. 試験実施概要

3.1 表題

1,3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3.2 試験番号

B041800

3.3 試験目的

1,3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

(1) 新規化学物質等に係る試験の方法について

（平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号 厚生労働省医薬食品局長、平成 15・11・13 製局第 2 号 経済産業省製造産業局長、環保企発第 031121002 号 環境省総合環境政策局長連名通知）

(2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (No. 473, 1997)

3.5 適用 GLP

(1) 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について

（厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 15 年 11 月 21 日）

(2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

3.6 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

東京都千代田区霞ヶ関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所

東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

5. 要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、1,3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

予備試験の結果に基づき、細胞増殖抑制試験は、短時間処理法 S9 mix 非共存下（以下-S9 mix）および S9 mix 共存下（以下+S9 mix），連続処理法 24 時間処理（以下 24 時間処理）で各々下記の用量を設定した。

-S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

+S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

24 時間処理 : 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

この結果、50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は-S9 mix で 297 $\mu\text{g}/\text{mL}$, +S9 mix で 353 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。一方、24 時間処理では 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかつたため、下記の用量を設定して細胞増殖抑制試験-2 を実施した。

24 時間処理 : 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

この結果、 IC_{50} は 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

算出した IC_{50} に基づき、染色体異常試験は下記の用量を設定した。

-S9 mix : 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

+S9 mix : 250, 300, 350, 400, 450, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

標本観察の結果、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、-S9 mix の 400, 450, 500 で各々 8.5, 16.8, 16.5% を示した。一方、+S9 mix では、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において 5.5%（疑陽性：5%以上 10%未満）であったため、400, 450, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量について確認試験を実施した。

標本観察の結果、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理用量においても 5%未満を示し、染色体構造異常誘発の再現性は認められなかつた。

従って、1,3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンは、当試験条件下（短時間処理法 S9 mix 非共存下）において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有するものと結論した。

表1 細胞増殖抑制試験の結果（短時間処理法）

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)	
	-S9 mix	+S9 mix
陰性対照 (生理食塩液)	100	100
125	98	96
250	86	99
500	5	19
750	0	0
1000	0	0
1250	0	0
1500	0	0

表2 細胞増殖抑制試験の結果（連続処理法）

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)	
	24時間処理	
	細胞増殖抑制試験	細胞増殖抑制試験-2
陰性対照 (生理食塩液)	100	100
12.5	102	
25	104	
50	121	
75	110	
100	123	106
125	115	
150	110	95
200	86	106
250		100
300		76
350		26
400		3
450		1
500		1

表3 分裂指数測定結果（本試験）

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	相対分裂指数 (%)
陰性対照 (生理食塩液)	-	0	1000	49	4.9	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン	-	200	1000	37	3.7	76
	-	250	1000	50	5.0	102
	-	300	1000	45	4.5	92
	-	350	1000	40	4.0	82
	-	400	1000	13	1.3	27
	-	450	1000	7	0.7	14
	-	500	1000	20	2.0	41
陰性対照 (生理食塩液)	+	0	1000	85	8.5	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン	+	250	1000	94	9.4	111
	+	300	1000	97	9.7	114
	+	350	1000	90	9.0	106
	+	400	1000	47	4.7	55
	+	450	1000	39	3.9	46
	+	500	1000	34	3.4	40

表4 分裂指数測定結果（確認試験）

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	相対分裂指数 (%)
陰性対照 (生理食塩液)	+	0	1000	95	9.5	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン	+	400	1000	104	10.4	109
	+	450	1000	76	7.6	80
	+	500	1000	50	5.0	53

表 5 染色体異常試験の結果 (本試験)

被験物質の名称 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン

処理-回復 時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 (μg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)						ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数の異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	-	陰性対照 (生理食塩液)	100 1	0	0	0	0	0	1	0	99	100 0	0	0
			100 0	1	0	0	0	0	1	0	101	100 0	0	0
			200 1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	200	100 0	0	0	0	0	0	0	95	100 0	0	0	0
			100 0	0	0	0	0	0	0	90	100 0	0	0	0
			200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	92	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	250	100 0	0	0	0	0	0	0	87	100 0	0	0	0
			100 0	0	1	0	0	0	1	92	100 0	0	0	0
			200 0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	89	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	300	100 0	0	0	0	0	0	0	84	100 0	0	0	0
			100 0	0	0	1	0	0	1	85	100 0	0	0	0
			200 0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	85	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	350	100 0	0	0	0	0	0	0	36	100 0	0	0	0
			100 0	1	1	0	0	2	0	42	100 0	0	0	0
			200 0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	39	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	400	100 0	6	0	0	0	0	6	0	10	100 0	0	0
			100 5	7	0	0	0	0	11	2	14	100 0	0	0
			200 5 (2.5)	13 (6.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (8.5)	2	12	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	450	82 6	10	0	1	0	16	0	8	82 2	0	0	2
			73 4	6	2	0	0	10	1	5	73 0	0	0	0
			155 10 (6.5)	16 (10.3)	2 (1.3)	1 (0.6)	0 (0.0)	26 (16.8)	1	7	155 2 (1.3)	0 (0.0)	2 (1.3)	0 (0.0)
6-18	-	500	100 4	12	0	0	0	0	15	1	5	100 0	0	0
			100 4	15	0	0	0	0	18	1	6	100 0	0	0
			200 8 (4.0)	27 (13.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	33 (16.5)	2	5	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100 12	27	0	0	0	0	34	0	100 0	0	0	0
			100 13	32	0	0	0	0	43	1	100 0	0	0	0
			200 25 (12.5)	59 (29.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	77 (38.5)	1	2	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (生理食塩液)	100 1	1	0	0	0	1	0	103	100 0	0	0	0
			100 0	0	0	0	0	0	0	97	100 0	0	0	0
			200 1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	250	100 1	0	0	1	0	0	1	0	94	100 0	0	0
			100 0	0	0	1	0	0	1	0	95	100 0	0	0
			200 1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	95	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	300	100 0	0	0	0	0	0	0	0	91	100 0	0	0
			100 1	2	0	1	0	3	0	94	100 0	0	0	0
			200 1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	92	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	350	100 0	0	0	0	0	0	0	0	95	100 0	0	0
			100 0	0	0	0	0	0	0	1	98	100 0	0	0
			200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	97	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	400	100 0	0	0	0	0	0	0	0	77	100 0	0	0
			100 0	0	0	0	0	0	0	0	84	100 0	0	0
			200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	80	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	450	100 2	1	0	0	0	3	2	45	100 1	0	0	1
			100 0	1	0	0	0	1	0	46	100 0	0	0	0
			200 2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	2	45	200 1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)
6-18	+	500	100 2	3	2	0	0	7	0	28	100 0	0	0	0
			100 2	2	1	0	0	4	0	25	100 0	0	0	0
			200 4 (2.0)	5 (2.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (5.5)	0	27	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陽性対照 (BP20)	100 11	70	0	0	0	0	70	0	100 0	0	0	0
			100 24	77	0	0	0	0	78	0	100 0	0	0	0
			200 35 (17.5)	147 (73.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	148 (74.0)	0	200 0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC : マイトマイシンC, BP : ベンゾ [a] ピレン

被験物質の名称 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン

表 6 染色体異常試験の結果 (確認試験)

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量(μg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)						ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数の異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	+	陰性対照 (生理食塩液)	100	0	0	1	0	0	1	97	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	103	100	0	0
			200	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0	100	200	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	400	100	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	85	100	0	0	0
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	87	200	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	450	100	0	0	0	0	0	0	56	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	59	100	0	0	0
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	57	200	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	500	100	1	3	0	0	0	3	0	28	100	0	0
			100	1	1	0	0	0	2	0	43	100	0	0
			200	2(1.0)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.5)	0	36	200	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	陽性対照 (BP20)	100	4	79	0	0	0	79	0	100	0	0	0
			100	12	72	0	0	0	76	0	100	0	0	0
			200	16(8.0)	151(75.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	155(77.5)	0	100	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

BP : ベンゾ [a] ピレン

図1 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における細胞毒性(短時間処理法・-S9 mix)

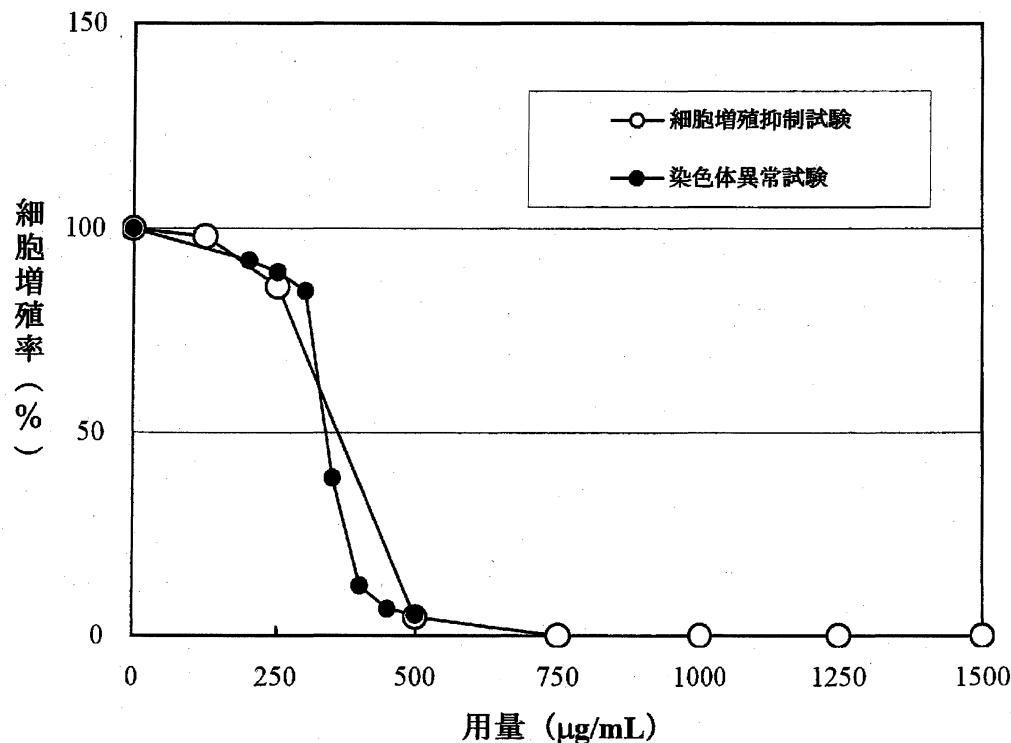


図2 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における細胞毒性(短時間処理法・+S9 mix)

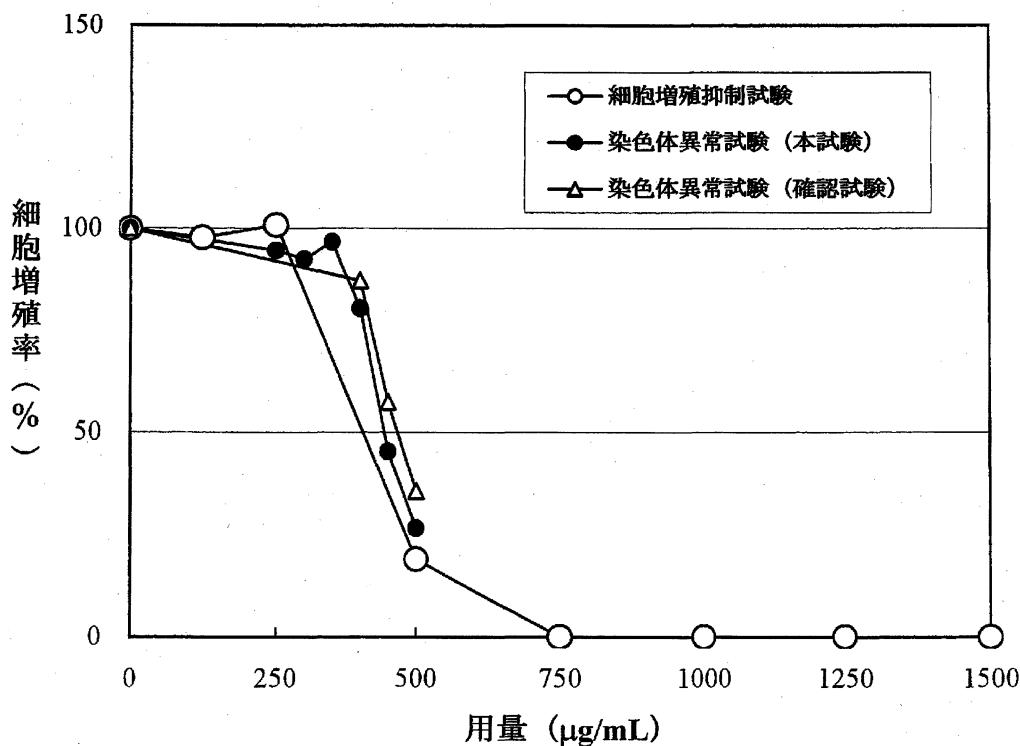


図3 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における細胞毒性(連続処理法)

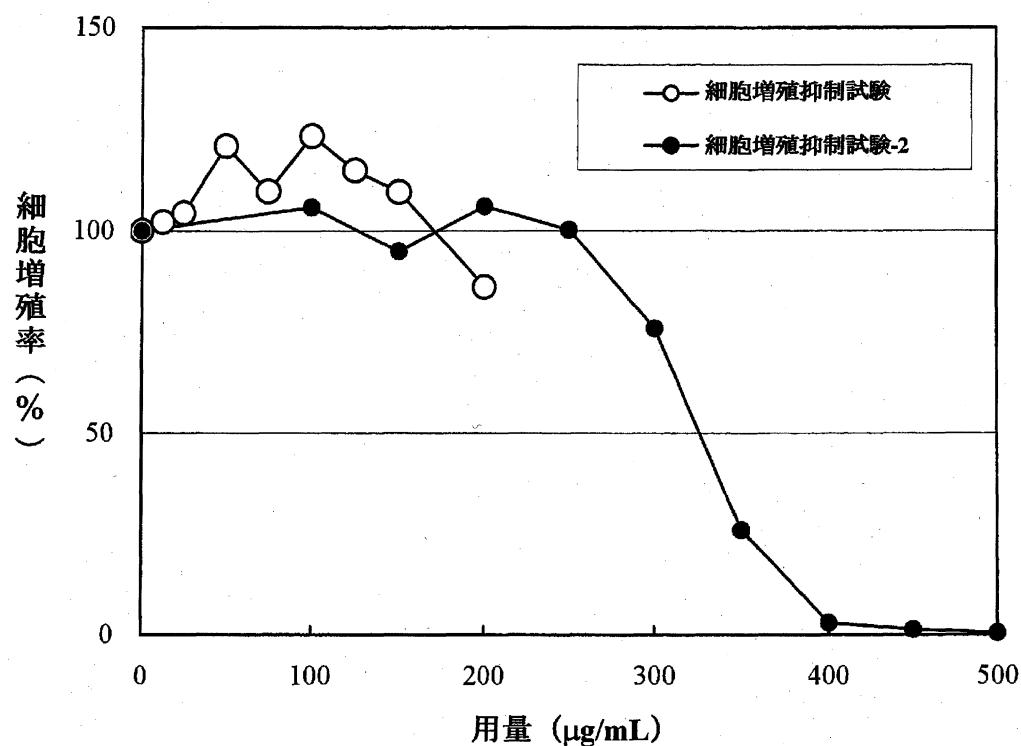


図4 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における構造異常細胞出現頻度

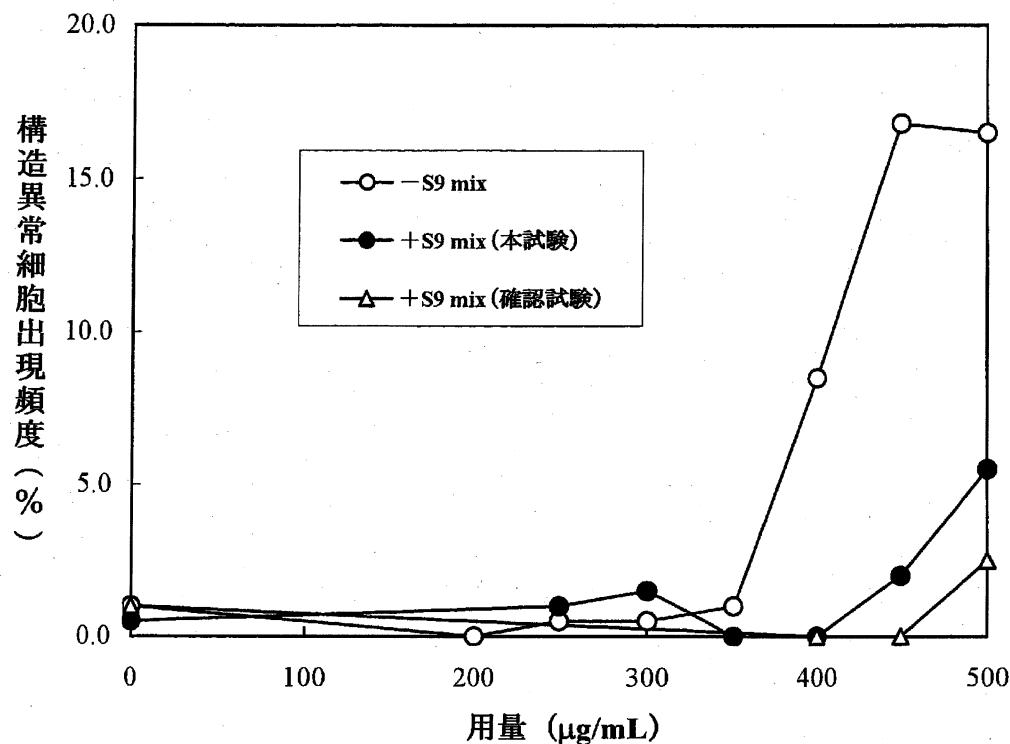
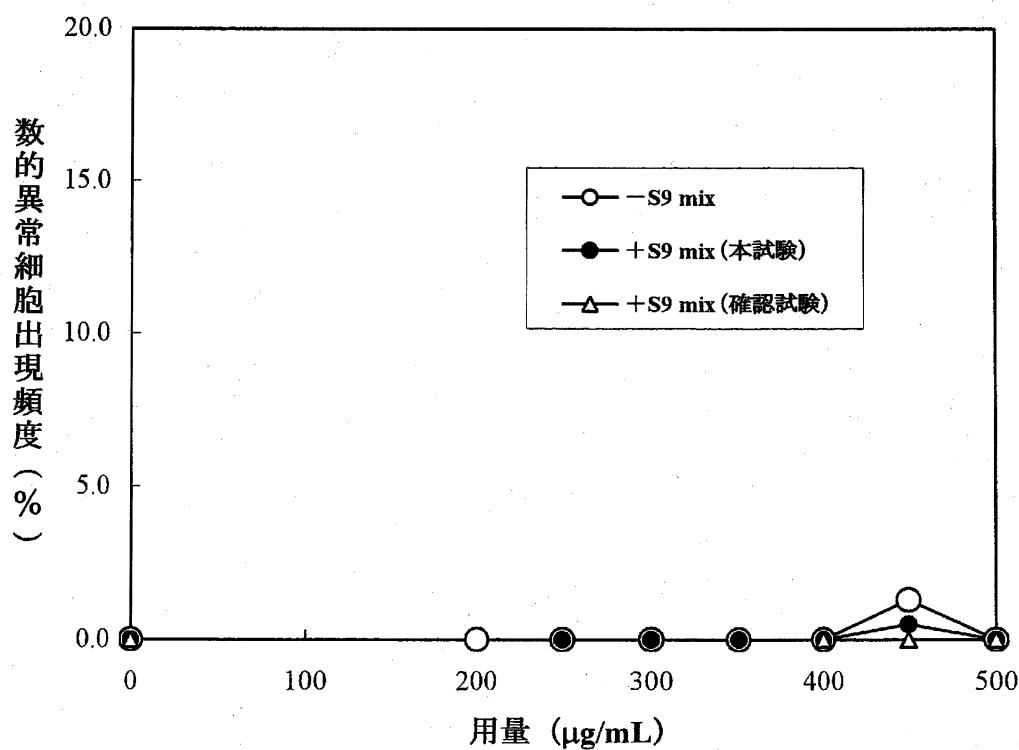


図5 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における数的異常細胞出現頻度



被験物質名：ブメトリゾール(CAS No. 3896-11-5)

試験系：Crj:CD(SD)IGS 雌ラット(SPF)

試験委託者：厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関 1 丁目 2 番 2 号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島 6 丁目 104 番地

試験目的：当試験は、ブメトリゾールが人に摂取された場合の健康への影響を推定するため
にブメトリゾールを雌ラットに 1 回経口投与し、その毒性について検討した。

準拠したガイドライン：

OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (Revised Guideline 423)

遵守した GLP：

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号)及び OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(OECD 化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

遵守した動物の福祉に関する法令など：

「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 11 年 12 月 22 日改正)、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号、平成 14 年 5 月 28 日一部改正)、「動物実験に関する指針」(昭和 62 年 5 月 22 日社団法人日本実験動物学会)及び株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所「動物実験倫理委員会規則」

試験開始日：2005 年 3 月 1 日

試験終了日：2007 年 1 月 30 日

要約

ブメトリゾールを雌ラットに 1 回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は、第 1 回試験及び第 2 回試験とも 2000 mg/kg とした。媒体には 0.5 w/v% メチルセルロース溶液を用いた。使用動物数は各 3 例とした。

1. 死亡状況及び一般状態

死亡例は、第 1 回試験及び第 2 回試験とも認められなかった。

一般状態において、第 1 回試験及び第 2 回試験とも異常はみられなかった。

2. 体重

第 1 回試験及び第 2 回試験とも、体重推移に異常はみられなかった。

3. 剖検

第 1 回試験及び第 2 回試験とも、剖検所見に異常はみられなかった。

以上の結果から、ブメトリゾールの LD₅₀ 値は 2000 mg/kg を越えると推定される。

5. 観察及び検査項目

5.1. 観察期間

投与後 14 日間とした.

5.2. 一般状態

投与日は投与後 6 時間(投与直後～投与後 30 分, 投与後 2, 4 及び 6 時間)まで, 投与翌日からの観察期間中は 1 日 1 回, 一般状態及び死亡の有無を観察した.

5.3. 体重測定

投与日(投与直前)並びに投与後 1, 3, 7, 10 及び 14 日に測定した(電子天秤:PG2002-S, メトラー・トレド株式会社).

5.4. 剖検

動物は, 観察期間終了時にジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した.

6. 統計解析

LD₅₀ 値は概略の範囲を推定した.

体重は, 各群で平均値及び標準偏差を算出した.

結果

1. 死亡状況, LD₅₀ 値及び一般状態 (Table 1～2, Appendix 1-1～1-2)

死亡例は, 第 1 回試験及び第 2 回試験とも認められなかった. 以上の結果から, ブメトリゾールの LD₅₀ 値は, 2000 mg/kg を越えると推定される.

一般状態において, 第 1 回試験及び第 2 回試験とも異常はみられなかった.

2. 体重 (Table 3, Appendix 2-1～2-2)

第 1 回試験及び第 2 回試験とも, 体重は順調に推移した.

3. 剖検 (Table 4, Appendix 3-1～3-2)

第 1 回試験及び第 2 回試験とも, 剖検所見に異常はみられなかった.

Table 1 Mortality and LD₅₀ value of female rats in single dose oral toxicity test of bumetizole

Group	mg/kg	Number of females	Number of deaths														Total number of deaths	LD ₅₀ (mg/kg)	
			Hours after administration				Days after administration												
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Test group 1 bumetizole	2000	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Test group 2 bumetizole	2000	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 General signs of female rats in single dose oral toxicity test of bumetizole

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Hours after administration				Days after administration													
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Test group 1 bumetizole	2000	Number of females Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Test group 2 bumetizole	2000	Number of females Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Table 3 Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of bumetizole

Group	Test group 1 bumetizole	Test group 2 bumetizole
mg/kg	2000	2000
Number of females	3	3
Days after administration		
0	185 ± 0	199 ± 2
1	203 ± 6	222 ± 2
3	209 ± 5	230 ± 2
7	220 ± 11	242 ± 5
10	232 ± 6	255 ± 7
14	239 ± 11	262 ± 10

Each value shows mean (g) ± S.D.

Study No. 402024

Table 4 Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of bumetizole

Group	Test group 1 bumetizole	Test group 2 bumetizole
mg/kg	2000	2000
Number of females	3	3
Findings		
Normal	3	3

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)	bumetizole [2-(2'-Hydroxy-3-tert-butyl-5'-methylphenyl)-5-chlorobenzotriazole] (ブメトリゾール)		
別 名	2-(2'-ヒドロキシ-3-tert-ブチル-5'-メチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール		
C A S 番号	3896-11-5		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、 その製法の概要)			
分子量	315.80		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	99.9%		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	01721IW4		
不純物の名称 及び含有率	—		
蒸気圧	7.5×10^{-7} Pa (20°C)		
対水溶解度	< 1 mg/L (20°C) EEC A6		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融 点	138-141°C		
沸 点	—		
常温における性状	淡黄色粉末、臭いなし		
安定性	分解温度: 350°C以上		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	—	—	—

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「分配係数」の欄には、分配係数、測定温度及び分配係数の測定に用いた溶媒名を記入すること。
- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 急性毒性試験又は反復投与予備試験等

試験 №	試験の種類 及び期間	動物種	1群当たり の動物数	投与 経路	投与量 (mg/kg)	概略の致死量 又はNOEL (mg/kg)	実験場所
1	単回投与毒性試験	ラット Crj:CD (SD) IGS	雌6匹	強制経口 投与	2000	GHSのカテゴリー5に分類される。 死亡例は認められなかった。	(株)日本バイオ リサーチセンタ ー 羽島研究所
2	投与量設定試験 (14日間)	ラット Crj:CD (SD) IGS	雄 5匹	強制経口 投与	0、250、500、 1000	死亡例は認められなかっ た。 一般状態、体重、摂餌量 及び剖検所見に異常は みられなかった。	(株)日本バイオ リサーチセンタ ー 羽島研究所

* NOEL: no observed effect level

4. 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

1) 反復投与毒性

被験物質投与期間	雄:2005年6月1日～2005年7月12日[計42日間], 雌(試験群):2005年6月1日～2005年7月26日[計44～56日間] 雌(回復群):2005年6月2日～2005年7月13日[計42日間]															
使用動物種・系統	ラット, Crl:CD(SD)				1群当たりの動物数											
投与経路	強制経口投与				対照群, 低用量群, 中用量群, 高用量群: 雄各12匹, 雌各12匹 (回復群: 対照群, 中用量群, 高用量群: 雄雌各6匹, 低用量群: 雄6匹)											
被験物質の純度 99.9%	投与量 (mg/kg)	対照群		低用量群		中用量群		高用量群		回復群						
		0		62.5		250		1000		0	62.5	250	1000			
性別		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
体重変化		—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	
摂餌量		—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	▽ ^{a)}	—	—	—	
一般状態		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
機能観察所見(N) FOB 立ち上がり	12	12	12	12	12	12	12	12	*	6	*	*	*	6	*	6
感覚反応		—	—	—	—	—	—	—	*	*	*	*	*	*	*	*
握力		—	—	—	—	—	—	—	*	*	*	*	*	*	*	*
自発運動量		—	—	—	▽ ^{a)}	—	—	—	*	*	*	*	*	*	*	*
尿所見		—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—
血液学的所見(N) 平均赤血球血色素濃度	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	*	6	6	6	6	6
血小板数		—	—	—	▼ ^{a)}	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—
リンパ球率		—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	△ ^{a)}	△ ^{a)}
好中球率		—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	▽ ^{a)}	▽ ^{a)}
血液生化学的所見(N) TP	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	*	6	6	6	6	6
T-Bil		—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—
Cl		—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—
肉眼的所見 例数(N)	6	12	6	12	6	12	6	12	6	6	*	6	6	6	6	6
精巣上体尾部		—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—
黄白色結節	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—
器官重量変化(N) 絶対重量	6	11	6	12	6	12	6	11	6	6	*	6	6	6	6	6
相対重量	—	—	—	—	△ ^{a)}	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—
卵巣	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	▽ ^{a)}	—

*: 検査せず.

—: 変化なし, あるいは対照群との間に有意差なし.

△▽: 5%有意差. ▲▼: 1%有意差.

a): 毒性学的影響ではないと判断.

投与量 (mg/kg)	対照群			低用量群			中用量群			高用量群				
性別	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Grade	—	±	+~	—	±	+~	—	±	+~	—	±	+~	—	±
病理組織学的所見 投与期間終了時														
肺 泡沫細胞の集簇 (N)	4	2	0	*	*	*	*	*	*	*	5	1 ^{a)}	0	
空腸 パイエル氏板の鉱質沈着 (N)	6	0	0	*	*	*	*	*	*	*	5	1 ^{a)}	0	
精巣上体 リンパ細胞浸潤 (N)	5	1	0	*	*	*	*	*	*	*	6	0	0	
	片側性精子肉芽腫 (N)	5	1	0	*	*	*	*	*	*	6	0	0	
前立腺 リンパ細胞浸潤 (N)	6	0	0	*	*	*	*	*	*	5	1 ^{a)}	0		
性別	♀			♀			♀			♀		♀		
Grade	—	±	+~	—	±	+~	—	±	+~	—	±	+~	—	±
病理組織学的所見 投与期間終了時														
空腸 パイエル氏板の鉱質沈着 (N)	6	0	0	*	*	*	*	*	*	5	1 ^{a)}	0		
脾臓 隹外造血 (N)	3	3	0	*	*	*	*	*	*	5	1 ^{a)}	0		
眼球 右網膜異形成 (N)	6	0	0	*	*	*	*	*	*	5	1 ^{a)}	0		
NOEL	雄: 1000 mg/kg/day を超える. 雌: 1000 mg/kg/day を超える.													
NOEL の推定根拠 とした変化	雄では、1000 mg/kg 投与でいずれの項目にも影響が認められなかったため。 雌では、1000 mg/kg 投与でいずれの項目にも影響が認められなかったため。													

* NOEL: no observed effect level

—: 変化なし, ±: ごく軽度, +~: 軽度, 中等度, 高度.

a): 毒性学的影響ではないと判断.

2) 生殖発生毒性

投与量 (mg/kg)	対照群 0	低用量群 62.5	中用量群 250	高用量群 1000
親動物				
発情回数	3.1	3.5	3.4	3.3
交尾率(%)	100.0	100.0	100.0	100.0
受胎率(%)	91.7	100.0	100.0	91.7
妊娠黄体数	16.4	15.6	17.3	16.5
着床数	14.4	15.0	15.7	15.4
着床率(%)	88.0	96.3△ ^{a)}	90.3	93.7
妊娠母獣数	11	12	12	11
生児出産母獣数	11	12	12	11
出産率(%)	100.0	100.0	100.0	100.0
妊娠期間	22.3	22.5	22.3	22.3
新生児				
総出産児数	13.8	13.8	14.0	14.7
分娩率(%)	95.2	89.7	85.5▽ ^{a)}	93.5
児の出産率(%)	95.3	89.7	85.5▽ ^{a)}	93.5
生存児数（哺育 0 日）	13.6	13.4	13.4	14.4
出生率(%)	98.9	97.0	95.8	97.5
性比 (♂/♀, 哺育 0 日)	1.06	1.34	2.24	1.21
生存児数（哺育 4 日）	13.5	13.1	13.3	14.2
生存率(%)	98.6	97.5	98.9	98.7
性比 (♂/♀, 哺育 4 日)	1.06	1.43	2.25	1.21
体重（哺育 0 日）		-/-	-/-	-/-
体重（哺育 4 日）		-/-	-/-	-/-
外表異常所見 (N)	-	-	-	無尾 (1) ^{b)}
剖検所見 (N)	-	-	腹腔内器官の欠損 (1) ^{b)}	-
NOEL	親動物: 雌雄ともに 1000 mg/kg/day を超える。 児動物: 1000 mg/kg/day を超える。			
NOEL の推定根拠 とした変化	雄では、1000 mg/kg 投与でいずれの項目にも影響が認められなかったため。 雌では、1000 mg/kg 投与でいずれの項目にも影響が認められなかったため。 児動物では、1000 mg/kg 投与で生存性及び体重などに影響が認められなかったため。			

* NOEL: no observed effect level

-/-: ♂/♀

交尾率(%) = (交尾確認動物数/交配動物数) × 100

受胎率(%) = (妊娠確認動物数/交尾確認動物数) × 100

着床率(%) = (着床数/妊娠黄体数) × 100

出産率(%) = (新生児出産母獣数/妊娠母獣数) × 100

妊娠期間 = 哺育 0 日[分娩確認日] (年月日) - 妊娠 0 日 (年月日)

分娩率(%) = (総出産児数/着床数) × 100

児の出産率(%) = (哺育 0 日新生児数/着床数) × 100

出生率(%) = (哺育 0 日生存児数/総出産児数) × 100

生存率(%) = (哺育 4 日生存児数/哺育 0 日生存児数) × 100

-: 変化なし、あるいは対照群との間に有意差なし。

△▽: 5%有意差。

a): 毒性学的影響ではないと判断。

b): 偶発例と判断。

被験物質名：ブメトリゾール(CAS No.3896-11-5)

試験系：CrI:CD(SD)雌雄ラット(SPF)

試験委託者：厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関 1 丁目 2 番 2 号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島 6 丁目 104 番地

試験目的：当試験は、ブメトリゾールが継続的に人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、ブメトリゾールを雌雄ラットに反復経口投与し、毒性学的影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎及び分娩などの雌雄動物の生殖行動に及ぼす影響を検討した。

準拠したガイドライン：

OECD Guideline for Testing of Chemicals for Combined Repeat Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (422)

遵守した GLP：

新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準

(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号)

OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE

(OECD 化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

遵守した動物の福祉に関する法令など：

「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 11 年 12 月 22 日改正)、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号、平成 14 年 5 月 28 日一部改正)、「動物実験に関する指針」(昭和 62 年 5 月 22 日社団法人日本実験動物学会)及び株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所「動物実験倫理委員会規則」

試験開始日：2005 年 5 月 6 日

試験終了日：2007 年 1 月 30 日

要約

ブメトリゾールのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する一般毒性学的影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎及び分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、1000 mg/kg を高用量とし、以下 250 及び 62.5 mg/kg とした。対照として媒体(0.5 w/v% メチルセルロース溶液)投与群を設けた。各群の使用動物数は試験群を雌雄各 12 例とし、雄では各群ともそのうち半数を回復群とした。雌では、試験群とは別に対照群、250 及び 1000 mg/kg 群に各 6 例の回復群を設けた。

I. 反復投与毒性

1. 一般状態及び死亡状況

死亡例及び瀕死例は、いずれの群にも認められなかった。

一般状態の異常は、いずれの群にもみられなかった。

2. 体重及び摂餌量

体重及び摂餌量では、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

3. 行動機能 (FOB) 観察、感覚反応検査、握力測定及び自発運動量測定

行動機能 (FOB)、感覚反応、握力及び自発運動量では、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

4. 尿検査、血液学検査及び血液生化学検査

尿検査、血液学検査及び血液生化学検査において、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

5. 剖検所見及び器官重量

剖検及び器官重量において、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

6. 病理組織学検査

病理組織学検査において、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物の生殖発生に及ぼす影響

交配開始前の投与期間(14 日間)の発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎雌数、受胎率、妊娠期間、出産率、分娩状態、哺育状態、妊娠黄体数、着床数及び着床率には、投与に起因する変化はみられなかった。

2. 児動物 (F_1) に及ぼす影響

総出産児数, 死産児数, 哺育 0 日の新生児数, 哺育 0 日の性比, 分娩率, 児の産出率及び出生率には, 投与に起因する変化はみられなかった.

一般状態, 哺育 4 日の生存児数, 哺育 4 日の性比及び哺育 4 日の生存率には, 投与に起因する変化はみられなかった.

外表, 体重及び剖検において, 投与に起因する変化はみられなかった.

以上のように, ブメトリゾールの無影響量は, 雌雄とも 1000 mg/kg 投与でいずれの項目にも影響が認められなかつたことから 1000 mg/kg/day を越えると考えられる. また, 生殖発生毒性学的な無影響量は, 雌雄とも 1000 mg/kg 投与でいずれの項目にも影響が認められなかつたことから 1000 mg/kg/day を越えると考えられる. 児動物への無影響量は, 1000 mg/kg 投与で生存性及び体重などに影響が認められなかつたことから 1000 mg/kg/day を越えると考えられる.

結果

I. 反復投与毒性

1. 一般状態

1.1. 雄 (Table 1-1～1-5, Appendix 1-1～1-4)

死亡例及び瀕死例は、いずれの群にも認められなかった。

投与期間中及び回復期間中とも、一般状態の異常はいずれの群にもみられなかった。

1.2. 試験群雌 (Table 2-1, 2-2, 3-1, 3-2 及び 4, Appendix 2-1～2-4, 3-1～3-4 及び 4-1～4-4)

死亡例及び瀕死例は、いずれの群にも認められなかった。

交配開始前、交配期間中、妊娠期間中及び哺育期間中とも、一般状態の異常はいずれの群にもみられなかった。

1.3. 回復群雌 (Table 5-1～5-5, Appendix 5-1～5-3)

死亡例及び瀕死例は、いずれの群にも認められなかった。

投与期間中及び回復期間中とも、一般状態の異常はいずれの群にもみられなかった。

2. 体重

2.1. 雄 (Table 6, Fig.2, Appendix 6-1～6-4)

投与期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

回復期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

2.2. 試験群雌 (Table 7～9, Fig.3, Appendix 7-1～7-4, 8-1～8-4 及び 9-1～9-4)

交配開始前及び交配期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

妊娠期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

哺育期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

2.3. 回復群雌 (Table 10, Fig.4, Appendix 10-1～10-3)

投与期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

回復期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

3. 摂餌量

3.1. 雄 (Table 11, Fig.5, Appendix 11-1～11-4)

投与期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

回復期間中には、1000 mg/kg 群では対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。250 mg/kg 群では、対照群と比べて回復 5 日に摂餌量の有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

3.2. 試験群雌 (Table 12~14, Fig.6, Appendix 12-1~12-4, 13-1~13-4 及び 14-1~14-4)

交配開始前には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。妊娠期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。哺育期間中には、各投与群とも対照群と比べて測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

3.3. 回復群雌 (Table 15, Fig.7, Appendix 15-1~15-3)

投与期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。回復期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

4. 行動機能 (FOB)

4.1. 雄 (Table 16-1~16-6, Appendix 16-1~16-4)

各投与群とも、各検査日のいずれの項目にも異常はみられなかった。

4.2. 試験群雌 (Table 17-1~17-6, Appendix 17-1~17-4)

各投与群とも、各検査日のいずれの項目にも異常はみられなかった。

4.3. 回復群雌 (Table 18-1~18-6, Appendix 18-1~18-3)

1000 mg/kg 群では、対照群と比べて各検査日のいずれの項目にも異常はみられなかった。250 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 36 日に立ち上がり回数の有意な高値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。また、250 mg/kg 群では、投与前に立ち上がり回数の有意な高値がみられた。

5. 感覚反応

5.1. 雄 (Table 19, Appendix 19-1~19-4)

各投与群とも、いずれの項目にも異常はみられなかった。

5.2. 試験群雌 (Table 20, Appendix 20-1~20-4)

各投与群とも、いずれの項目にも異常はみられなかった。

6. 握力

6.1. 雄 (Table 21, Appendix 21-1~21-4)

各投与群とも、対照群と比べて前肢及び後肢の握力に有意差はみられなかった。

6.2. 試験群雌 (Table 22, Appendix 22-1~22-4)

各投与群とも、対照群と比べて前肢及び後肢の握力に有意差はみられなかった。

7. 自発運動量

7.1. 雄 (Table 23, Appendix 23-1～23-4)

1000 及び 62.5 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。250 mg/kg 群では、対照群と比べて投与後 60 分に歩行量及び立ち上がり回数の有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

7.2. 試験群雌 (Table 24, Appendix 24-1～24-4)

各投与群とも、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

8. 尿検査

8.1. 投与期間終了前

8.1.1. 雄 (Table 25-1 及び 25-2, Appendix 25-1～25-4)

各投与群とも、対照群と比べて尿量及び尿比重に有意差はみられなかった。

各投与群とも、色調、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン及び沈渣は対照群とほぼ同程度であった。

8.1.2. 試験群雌 (Table 26-1 及び 26-2, Appendix 26-1～26-4)

各投与群とも、対照群と比べて尿量及び尿比重に有意差はみられなかった。

各投与群とも、色調、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン及び沈渣は対照群とほぼ同程度であった。

8.2. 回復期間終了前

8.2.1. 雄 (Table 27-1 及び 27-2, Appendix 27-1～27-4)

各投与群とも、対照群と比べて尿量及び尿比重に有意差はみられなかった。

各投与群とも、色調、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン及び沈渣は対照群とほぼ同程度であった。

8.2.2. 回復群雌 (Table 28-1 及び 28-2, Appendix 28-1～28-3)

各投与群とも、対照群と比べて尿量及び尿比重に有意差はみられなかった。

各投与群とも、色調、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン及び沈渣は対照群とほぼ同程度であった。

9. 血液学検査

9.1. 投与期間終了時

9.1.1. 雄 (Table 29, Appendix 29-1～29-4)

各投与群とも、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

9.1.2. 試験群雌 (Table 30, Appendix 30-1～30-4)

1000 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。250 及び 62.5 mg/kg 群では、対照群と比べて血小板数の有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

9.2. 回復期間終了時

9.2.1. 雄 (Table 31, Appendix 31-1～31-4)

各投与群とも、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

9.2.2. 回復群雌 (Table 32, Appendix 32-1～32-3)

1000 mg/kg 群では、対照群と比べてリンパ球率の有意な高値及び好中球率の有意な低値がみられたが、軽度な変化であること、投与期間終了時にそれらの傾向は認められなかつたことから、投与に基づくものではないと判断される。250 mg/kg 群では、対照群と比べて MCHC の有意な高値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

10. 血液生化学検査

10.1. 投与期間終了時

10.1.1. 雄 (Table 33, Appendix 33-1～33-4)

1000 mg/kg 群では、対照群と比べて総ビリルビンの有意な低値がみられたが、軽度な変化であることから、毒性学的意義はないと考えられる。250 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。62.5 mg/kg 群では、対照群と比べて Cl の有意な高値、総蛋白及び総ビリルビンの有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

10.1.2. 試験群雌 (Table 34, Appendix 34-1～34-4)

各投与群とも、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

10.2. 回復期間終了時

10.2.1. 雄 (Table 35, Appendix 35-1～35-4)

各投与群とも、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

10.2.2. 回復群雌 (Table 36, Appendix 36-1～36-3)

各投与群とも、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

11. 剖検

11.1. 投与期間終了時

11.1.1. 雄 (Table 37, Appendix 37-1～37-4)

1000, 250 及び 62.5 mg/kg 群では、異常はみられなかった。対照群では、左精巣上体尾部に黄白色結節が 1 例にみられた。

11.1.2. 試験群雌 (Table 38, Appendix 38-1～38-4)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

11.2. 回復期間終了時

11.2.1. 雄 (Table 39, Appendix 39-1～39-4)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

11.2.2. 回復群雌 (Table 40, Appendix 40-1～40-3)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

12. 器官重量

12.1. 投与期間終了時

12.1.1. 雄 (Table 41, Appendix 41-1～41-4)

剖検日の体重は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、各投与群とも対照群と比べて各器官の絶対重量及び相対重量に有意差はみられなかった。

12.1.2. 試験群雌 (Table 42, Appendix 42-1～42-4)

剖検日の体重は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、1000 及び 250 mg/kg 群では対照群と比べて各器官の絶対重量及び相対重量に有意差はみられなかった。62.5 mg/kg 群では、対照群と比べて胸腺の相対重量の有意な高値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

12.2. 回復期間終了時

12.2.1. 雄 (Table 43, Appendix 43-1～43-4)

剖検日の体重は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、各投与群とも対照群と比べて各器官の絶対重量及び相対重量に有意差はみられなかった。

12.2.2. 回復群雌 (Table 44, Appendix 44-1～44-3)

剖検日の体重は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、1000 mg/kg 群では対照群と比べて各器官の絶対重量及び相対重量に有意

差はみられなかった。250 mg/kg 群では、対照群と比べて卵巣の絶対重量及び相対重量の有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

13. 病理組織学検査

13.1. 投与期間終了時

13.1.1. 雄 (Table 45, Appendix 45-1～45-2)

肺：泡沫細胞集簇が 1000 mg/kg 群で 1 例と対照群で 2 例にみられた。

空腸：パイエル氏板の鉱質沈着が 1000 mg/kg 群で 1 例にみられた。

精巣上体：リンパ細胞浸潤及び片側性精子肉芽腫が対照群で 1 例にみられた。

前立腺：リンパ細胞浸潤が 1000 mg/kg 群で 1 例にみられた。

なお、これらの変化は対照群でも通常観察される変化であること、それらの程度はいずれもごく軽度であること、1000 mg/kg 群のそれらの出現頻度は対照群と比べて差がないことから、偶発的変化と判断される。

その他には、1000 mg/kg 群及び対照群では、心臓、気管、肝臓、脾臓、舌下腺、顎下腺、食道、胃、十二指腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胸腺、脾臓、下頸リンパ節、腸間膜リンパ節、腎臓、膀胱、精巣、精嚢、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、大脳、小脳、延髄、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髄(胸骨・大腿骨)及び骨(胸骨・大腿骨)に異常はみられなかった。

13.1.2. 試験群雌 (Table 46, Appendix 46-1～46-2)

空腸：パイエル氏板の鉱質沈着が 1000 mg/kg 群で 1 例にみられた。

脾臓：髓外造血が 1000 mg/kg 群で 1 例と対照群で 3 例にみられた。

眼球：右網膜異形成が 1000 mg/kg 群で 1 例にみられた。

なお、これらの変化は対照群でも通常観察される変化であること、それらの程度はいずれもごく軽度であること、1000 mg/kg 群のそれらの出現頻度は対照群と比べて差がないことから、偶発的変化と判断される。

その他には、1000 mg/kg 群及び対照群では、心臓、肺、気管、肝臓、脾臓、舌下腺、顎下腺、食道、胃、十二指腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胸腺、下頸リンパ節、腸間膜リンパ節、腎臓、膀胱、卵巣、子宮、腎、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、大脳、小脳、延髄、脊髄、坐骨神経、ハーダー腺、骨髄(胸骨・大腿骨)、骨(胸骨・大腿骨)及び乳腺に異常はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物の生殖発生

1.1. 発情回数 (Table 47, Appendix 47-1～47-4)

交配開始前の投与期間(14 日間)の発情回数は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

1.2. 交尾所要日数, 交尾率, 受胎雌数及び受胎率 (Table 47, Appendix 47-1~47-4)

いずれの群とも全例が交尾した。交尾率は、いずれの群とも 100.0% であった。交尾所要日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

不受胎雌は、対照群及び 1000 mg/kg 群で各 1 例にみられた。受胎率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

1.3. 妊娠期間 (Table 48, Appendix 48-1~48-4)

妊娠期間は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

1.4. 妊娠黄体数, 着床数及び着床率 (Table 48, Appendix 48-1~48-4)

1000 及び 250 mg/kg 群では、対照群と比べて妊娠黄体数、着床数及び着床率に有意差はみられなかった。62.5 mg/kg 群では、対照群と比べて着床率の有意な高値がみられたが、投与量に関連したものではないことから、投与による影響とは考えられない。

1.5. 出産率, 分娩状態及び哺育状態 (Table 48 及び 49, Appendix 48-1~48-4 及び 49-1~49-4)

出産率は、いずれの群とも 100.0% であった。

分娩状態及び哺育状態において、いずれの群とも異常はみられなかった。

2. 児動物 (F_1)

2.1. 総出産児数, 死産児数, 哺育 0 日の新生児数, 哺育 0 日の性比, 分娩率, 児の産出率及び出生率 (Table 48, Appendix 48-1~48-4)

1000 及び 62.5 mg/kg 群では、対照群と比べて総出産児数、死産児数、哺育 0 日の新生児数、哺育 0 日の性比、分娩率、児の産出率及び出生率に有意差はみられなかった。250 mg/kg 群では、対照群と比べて分娩率及び児の産出率の有意な低値がみられたが、投与量に関連したものではないことから、投与による影響とは考えられない。

2.2. 児動物の一般状態, 哺育 4 日の生存児数, 哺育 4 日の性比, 哺育 4 日の生存率及び外表異常 (Table 48 及び 50, Appendix 48-1~48-4 及び 50-1~50-4)

各投与群とも、対照群と比べて哺育 4 日の生存児数、哺育 4 日の性比及び哺育 4 日の生存率に有意差はみられなかった。

新生児の外表異常としては、1000 mg/kg 群で無尾が 1 例にみられたが、対照群との間に有意差は認められず、自然発生例と考えられる。

児動物の一般状態において、いずれの群とも異常はみられなかった。

2.3. 児動物の体重 (Table 51, Appendix 51-1~51-4)

各投与群とも、対照群と比べて哺育 0 及び 4 日の雌雄別平均体重、哺育 0 及び 4 日の一腹平均体重、哺育 0 及び 4 日の一腹合計体重に有意差はみられなかった。

2.4. 死亡児の剖検 (Table 52, Appendix 52-1～52-4)

1000 及び 62.5 mg/kg 群並びに対照群では、異常はみられなかった。250 mg/kg 群では、腹腔内器官の欠損が 1 例にみられたが、投与量に関連したものではないことから、投与による影響とは考えられない。

2.5. 生存児の剖検 (Table 53, Appendix 53-1～53-4)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

考察

ブメトリゾールのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する一般毒性学的影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎及び分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、1000 mg/kg を高用量とし、以下 250 及び 62.5 mg/kg とした。

反復投与による毒性については、死亡例及び瀕死例は雌雄ともいずれの群にも認められなかった。一般状態の異常は、雌雄ともいずれの群にもみられなかった。体重及び摂餌量では、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。行動機能(FOB)、感覚反応、握力及び自発運動量では、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。尿検査、血液学検査、血液生化学検査、剖検、器官重量及び病理組織学検査において、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

親動物の生殖発生毒性については、交配開始前の投与期間(14 日間)の発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎雌数、受胎率、妊娠期間、出産率、分娩状態、哺育状態、妊娠黄体数、着床数及び着床率に投与に起因する変化はみられなかった。

児動物(F_1)については、総出産児数、死産児数、哺育 0 日の新生児数、哺育 0 日の性比、分娩率、児の産出率、出生率、一般状態、哺育 4 日の生存児数、哺育 4 日の性比、哺育 4 日の生存率、外表、体重及び剖検において、投与に起因する変化はみられなかった。

以上のように、ブメトリゾールの無影響量は、雌雄とも 1000 mg/kg 投与でいずれの項目にも影響が認められなかつたことから 1000 mg/kg/day を越えると考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄とも 1000 mg/kg 投与でいずれの項目にも影響が認められなかつたことから 1000 mg/kg/day を越えると考えられる。児動物への無影響量は、1000 mg/kg 投与で生存性及び体重などに影響が認められなかつたことから 1000 mg/kg/day を越えると考えられる。

Table 1-1 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post				
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
bumetizole	62.5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	250	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	1000	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-2 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
bumetizole	62.5	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	250	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	1000	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-3 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post				
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
bumetizole	62.5	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
	250	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
	1000	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-4 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration					
			40		41		42	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	6
bumetizole	62.5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	6
	250	Number of males Normal	12	12	12	12	12	6
	1000	Number of males Normal	12	12	12	12	12	6

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-5 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of recovery													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	0	Number of males	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
bumetizole	62.5	Number of males	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250	Number of males	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	1000	Number of males	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Table 2-1 General signs of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																			
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
bumetizole	62.5	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	250	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	1000	Number of females	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 2-2 General signs of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																									
			15*		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26		27	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post				
Control	0	Number of females	12	12	10	10	7	7	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Normal	12	12	10	10	7	7	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
bumetizole	62.5	Number of females	12	12	7	7	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Normal	12	12	7	7	3	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	250	Number of females	12	12	9	9	8	8	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
		Normal	12	12	9	9	8	8	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	1000	Number of females	12	12	8	8	4	4	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
		Normal	12	12	8	8	4	4	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			

Pre: Before administration, Post: after administration.

*: Start of pairing.

Table 3-1 General signs of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of pregnancy																														
			0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post			
Control	0	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11			
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11			
bumetizole	62.5	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
	250	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	1000	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 3-2 General signs of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of pregnancy																					
			15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3	3	0	0	0	0	0	0
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3	3	-	-	-	-	-	-
bumetizole	62.5	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	0	0	0	0	0	0
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	-	-	-	-	-	-
	250	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	4	0	0	0	0	0	0
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	4	-	-	-	-	-	-
	1000	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3	3	0	0	0	0	0	0
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3	3	-	-	-	-	-	-

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 4 General signs of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of lactation													
			0		1		2		3		4		5		6	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
bumetizole	62.5	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	250	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	1000	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 5-1 General signs of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																			
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
bumetizole	250	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	1000	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 5-2 General signs of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																									
			14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
bumetizole	250	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	1000	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 5-3 General signs of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																									
			27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6		
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6		
bumetizole	250	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6		
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6		
	1000	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 5-4 General signs of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration					
			40		41		42	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of females	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6
bumetizole	250	Number of females	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6
	1000	Number of females	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 5-5 General signs of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of recovery														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Control	0	Number of females Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
bumetizole	250	Number of females Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	1000	Number of females Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Table 6 Body weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of males	12	12	12	12	
Days of administration					
1	381 ± 12	380 ± 11	381 ± 12	380 ± 13	
4	395 ± 14	392 ± 12	389 ± 13	389 ± 12	
8	409 ± 20	404 ± 14	401 ± 14	404 ± 13	
11	419 ± 20	415 ± 18	410 ± 15	415 ± 15	
15	429 ± 22	425 ± 17	420 ± 18	422 ± 16	
18	434 ± 23	434 ± 22	427 ± 19	429 ± 18	
22	446 ± 23	446 ± 22	442 ± 20	442 ± 18	
25	456 ± 25	457 ± 23	452 ± 23	454 ± 21	
29	469 ± 26	468 ± 24	465 ± 23	463 ± 24	
32	477 ± 28	477 ± 23	473 ± 23	472 ± 24	
36	488 ± 30	488 ± 24	484 ± 26	481 ± 24	
39	495 ± 31	493 ± 25	489 ± 26	490 ± 24	
42	496 ± 32	497 ± 26	487 ± 26	490 ± 22	
Number of males	6	6	6	6	
Days of recovery					
1	507 ± 30	504 ± 26	494 ± 35	493 ± 30	
4	514 ± 32	512 ± 30	499 ± 36	499 ± 28	
8	523 ± 30	522 ± 27	508 ± 38	507 ± 30	
11	526 ± 31	529 ± 28	513 ± 39	509 ± 32	
14	535 ± 31	540 ± 29	521 ± 38	519 ± 32	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 7 Body weights of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of females	12	12	12	12	
Days of administration					
1	250 ± 7	250 ± 7	251 ± 6	249 ± 8	
4	259 ± 13	256 ± 9	257 ± 6	256 ± 10	
8	269 ± 15	266 ± 10	266 ± 7	264 ± 9	
11	272 ± 19	269 ± 8	266 ± 9	265 ± 10	
15	281 ± 21	277 ± 9	273 ± 10	272 ± 11	
18	280 ± 10 (6)	307 (1)	284 ± 12 (4)	279 ± 13 (4)	
22	-	-	-	323 (1)	
25	-	-	-	335 (1)	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 8 Body weights of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of dams	11	12	12	11	
Days of pregnancy					
0	285 ± 18	278 ± 13	278 ± 13	278 ± 20	
7	324 ± 18	319 ± 16	316 ± 20	316 ± 20	
14	359 ± 21	354 ± 19	351 ± 29	351 ± 24	
21	444 ± 27	444 ± 27	443 ± 37	443 ± 33	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 9 Body weights of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of dams	11		12		11
Days of lactation	0	334 ± 25	325 ± 24	330 ± 35	322 ± 29
	4	351 ± 27	347 ± 19	343 ± 26	349 ± 30
	6	335 ± 19	332 ± 22	334 ± 31	327 ± 31

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 10 Body weights of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole	
	0	250	250	1000
Number of females	6	6	6	6
Days of administration				
1	257 ± 7	258 ± 6	257 ± 7	
4	259 ± 13	267 ± 11	263 ± 11	
8	268 ± 11	277 ± 15	273 ± 17	
11	270 ± 10	279 ± 17	276 ± 15	
15	278 ± 12	288 ± 17	279 ± 16	
18	286 ± 13	298 ± 17	285 ± 13	
22	293 ± 15	305 ± 22	293 ± 12	
25	299 ± 16	311 ± 20	296 ± 11	
29	307 ± 19	316 ± 22	303 ± 12	
32	304 ± 17	317 ± 25	301 ± 9	
36	310 ± 20	324 ± 24	304 ± 9	
39	319 ± 19	325 ± 25	310 ± 14	
42	322 ± 20	328 ± 27	315 ± 15	
Number of females	6	6	6	
Days of recovery				
1	319 ± 22	327 ± 25	309 ± 13	
4	326 ± 24	333 ± 26	319 ± 13	
8	333 ± 25	338 ± 25	321 ± 12	
11	334 ± 23	344 ± 21	322 ± 9	
14	337 ± 27	348 ± 22	325 ± 8	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 11 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of males	12	12	12	12	
Days of administration					
2	25 ± 3	26 ± 3	24 ± 3	26 ± 3	
5	25 ± 3	25 ± 2	25 ± 2	25 ± 3	
9	24 ± 2	25 ± 2	24 ± 2	25 ± 3	
12	25 ± 2	26 ± 2	25 ± 3	26 ± 4	
30	26 ± 2	26 ± 2	25 ± 3	26 ± 3	
33	25 ± 2	26 ± 3	26 ± 3	25 ± 2	
37	26 ± 2	26 ± 2	26 ± 2	27 ± 2	
40	25 ± 2	26 ± 3	24 ± 2	26 ± 2	
Number of males	6	6	6	6	
Days of recovery					
2	24 ± 2	24 ± 2	23 ± 2	23 ± 2	
5	24 ± 2	23 ± 1	22 ± 1 *	22 ± 1	
9	26 ± 3	26 ± 2	26 ± 3	25 ± 2	
12	27 ± 3	27 ± 1	27 ± 2	27 ± 3	

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 12 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of females	12	12	12	12	
Days of administration					
2	19 ± 2	19 ± 3	18 ± 4	19 ± 2	
5	20 ± 2	20 ± 3	20 ± 3	19 ± 4	
9	19 ± 3	19 ± 3	18 ± 3	18 ± 4	
12	20 ± 3	19 ± 3	19 ± 3	18 ± 3	

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 13 Food consumption of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of dams	11	12	12	11	
Days of pregnancy					
2	22 ± 3	22 ± 2	21 ± 3	22 ± 2	
9	23 ± 3	25 ± 4	30 ± 22	24 ± 3	
16	24 ± 3	25 ± 4	25 ± 4	24 ± 3	
20	22 ± 3	23 ± 3	22 ± 3	23 ± 4	

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 14 Food consumption of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control	bumetizole		
		62.5	250	1000
mg/kg	0	62.5	250	1000
Number of dams	11	12	12	11
Days of lactation	2	30 ± 6	30 ± 3	27 ± 5
Each value shows mean (g/day) ± S.D.				

Table 15 Food consumption of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control			bumetizole		
	0	250	1000	6	6	6
Number of females	6	6	6	6	6	6
Days of administration						
2	18 ± 3	19 ± 3	17 ± 3	17 ± 3	20 ± 4	19 ± 3
5	19 ± 1	18 ± 3	17 ± 4	16 ± 3	14 ± 3	17 ± 3
9	18 ± 2	17 ± 4	20 ± 3	17 ± 2	19 ± 3	17 ± 2
12	17 ± 3	19 ± 3	19 ± 4	17 ± 2	19 ± 3	18 ± 2
16	17 ± 3	20 ± 3	19 ± 3	17 ± 2	19 ± 3	18 ± 2
19	20 ± 3	20 ± 4	18 ± 4	17 ± 2	19 ± 3	18 ± 2
23	18 ± 2	18 ± 4	18 ± 4	17 ± 2	19 ± 3	18 ± 2
26	20 ± 3	21 ± 4	21 ± 4	19 ± 3	19 ± 3	18 ± 2
30	18 ± 4	18 ± 4	18 ± 4	18 ± 2	19 ± 3	18 ± 2
33	21 ± 1	22 ± 2	22 ± 2	23 ± 3	23 ± 3	23 ± 3
37	18 ± 2	17 ± 1	17 ± 1	18 ± 2	18 ± 2	18 ± 2
40	18 ± 3	20 ± 3	20 ± 3	18 ± 3	19 ± 4	18 ± 3
Number of females	6	6	6	6	6	6
Days of recovery						
2	20 ± 3	21 ± 3	21 ± 3	18 ± 2	20 ± 2	19 ± 3
5	22 ± 4	19 ± 4	20 ± 4	20 ± 2	20 ± 2	20 ± 2
9	21 ± 4	20 ± 4	20 ± 4	19 ± 3	20 ± 4	19 ± 3
12	23 ± 6	19 ± 4	20 ± 4	20 ± 4	20 ± 4	20 ± 4

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 16-1 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of males	12	12	12	12	
Observation of animals in cages					
Posture	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 7	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 14	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 21	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 28	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 35	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 41	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Palpebral closure	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Biting behavior	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Clonic convulsions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Posture 1: Prone or recumbent position, 2: resting normally, 3: moving or running about, 4: jumping.

Palpebral closure 1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Biting behavior 1: Not observed, 2: observed.

Clonic convulsions 1: Not observed, 2: jaw convulsions, 3: tremor.

Table 16-2 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of males	12	12	12	12	
Observation of animals in cages					
Tonic convulsions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Tonic convulsions

1: Not observed, 2: tonic extension, 3: opisthotonus convulsions, 4: saltatory convulsions, 5: asphyxial convulsions.

Table 16-3 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of males	12	12	12	12	
Observation of animals on observer's palm					
Ease of removal from cage	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 7	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 14	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 21	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 28	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 35	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 41	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Ease of handling	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 7	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 14	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 21	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 28	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 35	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 41	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Muscle tone	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 7	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 14	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 21	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 28	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 35	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 41	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Fur conditions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Ease of removal from cage

1: Docile and allowing itself to be handled, 2: rearing or cowering, 3: running about; hard to catch.

Ease of handling

1: Docile and allowing itself to be handled, 2: struggling slightly or vocalizing, 3: struggling and trying to bite observer's hand.

Muscle tone

1: Decreased, 2: normal, 3: increased.

Fur conditions

1: Normal, 2: slightly soiled, 3: markedly soiled.

Table 16-4 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control		bumetizole		
mg/kg	0	62.5	250	1000	
Number of males	12	12	12	12	
Observation of animals on observer's palm					
Lacrimation	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Salivation	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Respiration	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Lacrimation 1: None, 2: mild, 3: marked.

Salivation 1: None, 2: mild, 3: marked.

Respiration 1: Normal, 2: bradypnea, 3: dyspnea.

Table 16-5 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole				1000
	0	62.5	12	250	12	12	
Number of males	12		12	12		12	
Open-field test							
Frequency of rearing Mean ± S.D.	Pre	8.8 ± 4.5	7.0 ± 4.0	7.3 ± 5.1	4.9 ± 4.1	3.7 ± 4.9	
	Day 7	3.3 ± 3.0	1.8 ± 2.1	2.7 ± 3.1	3.8 ± 3.7	3.8 ± 3.7	
	Day 14	2.0 ± 2.3	2.9 ± 3.3	1.0 ± 1.7	2.4 ± 2.5	2.4 ± 2.5	
	Day 21	2.3 ± 2.5	2.5 ± 2.5	2.1 ± 3.2	3.3 ± 2.6	3.3 ± 2.6	
	Day 28	3.3 ± 2.9	3.3 ± 4.9	4.1 ± 4.3	2.5 ± 2.5	2.5 ± 2.5	
	Day 35	3.4 ± 3.5	2.8 ± 3.1	3.2 ± 2.7	5.0 ± 3.7	5.0 ± 3.7	
	Day 41	5.1 ± 4.3	2.7 ± 3.7	4.0 ± 3.5			
Frequency of grooming Mean ± S.D.	Pre	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 14	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 21	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 28	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 35	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 41	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Gait Mean (range)	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
Palpebral closure Mean (range)	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	

Frequency of rearing (during a 2-minute period).

Frequency of grooming (during a 2-minute period).

Findings were graded as follows

Gait

1: Normal, 2: unmoving, 3: staggering, 4: hind-limbs extended and dragged, 5: all fours extended,
6: forelimbs extended and dragged; unable to support body, 7: standing on tiptoe.

Palpebral closure

1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Table 16-6 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of males	12	12	12	12	
Open-field test					
Consciousness	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 7	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 14	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 21	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 28	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 35	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 41	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Behavioral abnormalities	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Righting reflex	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Consciousness

1: Comatose; no response, 2: exploring behavior, 3: excited and moving spasmodically.

Behavioral abnormalities

1: Not observed, 2: straub's reaction, 3: moving backward, 4: writhing.

Righting reflex

1: Righting itself immediately, 2: requiring 3 seconds or longer to right itself, 3: unable to right itself.

Table 17-1 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of females	12	12	12	12	
Observation of animals in cages					
Posture	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 8	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 15	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 1 of pregnancy	2.0 (2) [11]	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2) [11]
	Day 8 of pregnancy	2.0 (2) [11]	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2) [11]
	Day 15 of pregnancy	2.0 (2) [11]	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2) [11]
	Day 3 of lactation	2.0 (2) [11]	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2) [11]
Palpebral closure	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
Biting behavior	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
Clonic convulsions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Posture 1: Prone or recumbent position, 2: resting normally, 3: moving or running about, 4: jumping.

Palpebral closure 1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Biting behavior 1: Not observed, 2: observed.

Clonic convulsions 1: Not observed, 2: jaw convulsions, 3: tremor.

Table 17-2 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of females	12	12	12	12	
Observation of animals in cages					
Tonic convulsions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Tonic convulsions 1: Not observed, 2: tonic extension, 3: opisthotonus convulsions, 4: saltatory convulsions, 5: asphyxial convulsions.

Table 17-3 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control 0	bumetizole 62.5	bumetizole 250	bumetizole 1000	
Number of females	12	12	12	12	
Observation of animals on observer's palm					
Ease of removal from cage Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]
Ease of handling Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]
Muscle tone Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]
Fur conditions Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Ease of removal from cage 1: Docile and allowing itself to be handled, 2: rearing or cowering, 3: running about; hard to catch.

Ease of handling 1: Docile and allowing itself to be handled, 2: struggling slightly or vocalizing, 3: struggling and trying to bite observer's hand.

Muscle tone 1: Decreased, 2: normal, 3: increased.

Fur conditions 1: Normal, 2: slightly soiled, 3: markedly soiled.

Table 17-4 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of females	12	12	12	12	
Observation of animals on observer's palm					
Lacration	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
Salivation	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
Respiration	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Lacration 1: None, 2: mild, 3: marked.

Salivation 1: None, 2: mild, 3: marked.

Respiration 1: Normal, 2: bradypnea, 3: dyspnea.

Table 17-5 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetrizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole			
	0	62.5	250	1000		
Number of females	12	12	12	12		
Open-field test						
Frequency of rearing Mean ± S.D.	Pre	9.3 ± 4.8	8.8 ± 4.3	8.4 ± 5.2	9.8 ± 5.4	
	Day 8	7.5 ± 3.8	8.5 ± 2.9	6.2 ± 4.7	8.9 ± 5.7	
	Day 15	5.7 ± 4.9	7.4 ± 4.6	6.0 ± 3.2	9.0 ± 7.4	
	Day 1 of pregnancy	3.7 ± 2.6 [11]	6.3 ± 3.8	4.4 ± 3.9	5.2 ± 3.8	[11]
	Day 8 of pregnancy	7.8 ± 4.8 [11]	6.1 ± 3.6	7.1 ± 3.2	6.7 ± 4.7	[11]
	Day 15 of pregnancy	6.3 ± 5.8 [11]	6.4 ± 3.8	6.4 ± 4.9	8.5 ± 5.4	[11]
	Day 3 of lactation	5.9 ± 4.6 [11]	5.7 ± 2.7	5.2 ± 3.7	5.2 ± 3.9	[11]
Frequency of grooming Mean ± S.D.	Pre	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.6	0.1 ± 0.3	
	Day 8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 15	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 1 of pregnancy	0.0 ± 0.0 [11]	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	[11]
	Day 8 of pregnancy	0.0 ± 0.0 [11]	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.6	[11]
	Day 15 of pregnancy	0.0 ± 0.0 [11]	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	[11]
	Day 3 of lactation	0.5 ± 0.9 [11]	0.3 ± 0.7	0.5 ± 0.9	0.1 ± 0.3	[11]
Gait Mean (range)	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
Palpebral closure Mean (range)	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Frequency of rearing (during a 2-minute period).

Frequency of grooming (during a 2-minute period).

Findings were graded as follows

Gait 1: Normal, 2: unmoving, 3: staggering, 4: hind-limbs extended and dragged, 5: all fours extended, 6: forelimbs extended and dragged; unable to support body, 7: standing on tiptoe.

1: eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Table 17-6 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of females	12	12	12	12	
Open-field test					
Consciousness Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]
Behavioral abnormalities Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]
Righting reflex Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Consciousness 1: Comatose; no response, 2: exploring behavior, 3: excited and moving spasmodically.

Behavioral abnormalities 1: Not observed, 2: straub's reaction, 3: moving backward, 4: writhing.

Righting reflex 1: Righting itself immediately, 2: requiring 3 seconds or longer to right itself, 3: unable to right itself.

Table 18-1 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control			bumetizole		
	0	250	1000	6	6	6
Observation of animals in cages						
Posture	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 8	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 15	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 22	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 29	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 36	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 42	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Palpebral closure	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Biting behavior	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Clonic convulsions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Posture 1: Prone or recumbent position, 2: resting normally, 3: moving or running about, 4: jumping.

Palpebral closure 1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Biting behavior 1: Not observed, 2: observed.

Clonic convulsions 1: Not observed, 2: jaw convulsions, 3: tremor.

Table 18-2 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control	bumetizole		
	0	250	1000	
Number of females	6	6	6	
Observation of animals in cages				
Tonic convulsions Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 22 Day 29 Day 36 Day 42	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)

Findings were graded as follows

Tonic convulsions

1: Not observed, 2: tonic extension, 3: opisthotonus convulsions, 4: saltatory convulsions, 5: asphyxial convulsions.

Table 18-3 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control			bumetizole		
	0	250	1000	0	250	1000
Number of females	6	6	6			
Observation of animals on observer's palm						
Ease of removal from cage	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 8	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 15	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 22	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 29	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 36	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 42	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Ease of handling	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 8	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 15	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 22	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 29	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 36	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 42	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Muscle tone	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 8	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 15	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 22	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 29	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 36	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 42	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Fur conditions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Ease of removal from cage

1: Docile and allowing itself to be handled, 2: rearing or cowering, 3: running about; hard to catch.

Ease of handling

1: Docile and allowing itself to be handled, 2: struggling slightly or vocalizing, 3: struggling and trying to bite observer's hand.

Muscle tone

1: Decreased, 2: normal, 3: increased.

Fur conditions

1: Normal, 2: slightly soiled, 3: markedly soiled.

Table 18-4 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control			bumetizole		
	0	250	1000	6	6	6
Number of females						
Observation of animals on observer's palm						
Lacrimation	Pre	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
Salivation	Pre	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
Respiration	Pre	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)

Findings were graded as follows

- Lacrimation 1: None, 2: mild, 3: marked.
 Salivation 1: None, 2: mild, 3: marked.
 Respiration 1: Normal, 2: bradypnea, 3: dyspnea.

Table 18-5 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group		Control		bumetizole								
mg/kg		0		250		1000						
Number of females		6		6		6						
Open-field test												
Frequency of rearing	Pre	5.5	±	2.9		10.7	±	2.9 *		6.2	±	3.3
Mean ± S.D.	Day 8	4.8	±	5.3		6.0	±	3.7		3.3	±	2.3
	Day 15	6.0	±	4.6		8.8	±	5.7		6.0	±	3.9
	Day 22	5.0	±	4.3		7.0	±	4.6		5.7	±	2.9
	Day 29	4.5	±	3.3		8.8	±	4.5		7.5	±	3.8
	Day 36	3.5	±	1.9		11.2	±	4.4 **		7.7	±	3.1
	Day 42	9.0	±	2.0		11.5	±	4.1		8.5	±	5.2
Frequency of grooming	Pre	0.0	±	0.0		0.0	±	0.0		0.2	±	0.4
Mean ± S.D.	Day 8	0.0	±	0.0		0.0	±	0.0		0.0	±	0.0
	Day 15	0.0	±	0.0		0.0	±	0.0		0.0	±	0.0
	Day 22	0.0	±	0.0		0.0	±	0.0		0.0	±	0.0
	Day 29	0.0	±	0.0		0.2	±	0.4		0.0	±	0.0
	Day 36	0.0	±	0.0		0.3	±	0.8		0.3	±	0.8
	Day 42	0.0	±	0.0		0.0	±	0.0		0.0	±	0.0
Gait	Pre	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
Mean (range)	Day 8	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
	Day 15	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
	Day 22	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
	Day 29	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
	Day 36	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
	Day 42	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
Palpebral closure	Pre	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
Mean (range)	Day 8	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
	Day 15	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
	Day 22	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
	Day 29	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
	Day 36	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	
	Day 42	1.0	(1)			1.0	(1)			1.0	(1)	

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Frequency of rearing (during a 2-minute period).

Frequency of grooming (during a 2-minute period).

Findings were graded as follows:

Gait 1: Normal, 2: unmoving, 3: staggering, 4: hind-limbs extended and dragged, 5: all fours extended.

6: forelimbs extended and dragged; unable to support body. 7: standing on tiptoe.

1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Table 18-6 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control			bumetizole		
	0	250	1000	6	6	6
Number of females						
Open-field test						
Consciousness	Pre	2.0 (2)		2.0 (2)		2.0 (2)
Mean (range)	Day 8	2.0 (2)		2.0 (2)		2.0 (2)
	Day 15	2.0 (2)		2.0 (2)		2.0 (2)
	Day 22	2.0 (2)		2.0 (2)		2.0 (2)
	Day 29	2.0 (2)		2.0 (2)		2.0 (2)
	Day 36	2.0 (2)		2.0 (2)		2.0 (2)
	Day 42	2.0 (2)		2.0 (2)		2.0 (2)
Behavioral abnormalities	Pre	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
Righting reflex	Pre	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)		1.0 (1)		1.0 (1)

Findings were graded as follows

Consciousness

1: Comatose; no response, 2: exploring behavior, 3: excited and moving spasmodically.

Behavioral abnormalities

1: Not observed, 2: straub's reaction, 3: moving backward, 4: writhing.

Righting reflex

1: Righting itself immediately, 2: requiring 3 seconds or longer to right itself, 3: unable to right itself.

Table 19 Sensory response of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole			
	0	62.5	250	1000		
Number of males	6	6	6	6		
Pupillary reflex						
Mean (range)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)		
Approaching behavior						
Mean (range)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)		
Response to touch						
Mean (range)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)		
Auditory reflex						
Mean (range)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)		
Pain reflex						
Mean (range)	3.0 (3)	3.0 (3)	3.0 (3)	3.0 (3)		

Findings were graded as follows.

- Pupillary reflex 1: Normal pupillary contraction observed, 2: pupils completely dilated, 3: pupils completely contracted.
- Approaching behavior 1: Not observed, 2: approaching and sniffing stimulus, 3: reacting to stimulus, including vocalizing,
4: jumping at or biting at stimulus.
- Response to touch 1: No response, 2: looking back and leaving stimulus, 3: reacting to stimulus, including vocalizing,
4: jumping at or biting at stimulus.
- Auditory reflex 1: Not observed, 2: hesitating at stimulus or moving ears, 3: jumping at and trying to bite at the source of sound.
- Pain reflex 1: Not observed, 2: slowly looking back or slowly moving forward to escape from stimulus,
3: quickly moving forward to escape from stimulus or biting at it immediately after looking back,
4: jumping forward to escape from stimulus, 5: loudly vocalizing and biting at stimulus after suddenly looking back.

Table 20 Sensory response of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control		bumetizole			
	mg/kg	0	62.5	250	1000	
Number of females		6	6	6	6	
Pupillary reflex						
Mean (range)	1.0	(1)	1.0	(1)	1.0	(1)
Approaching behavior						
Mean (range)	2.0	(2)	2.0	(2)	2.0	(2)
Response to touch						
Mean (range)	2.0	(2)	2.0	(2)	2.0	(2)
Auditory reflex						
Mean (range)	2.0	(2)	2.0	(2)	2.0	(2)
Pain reflex						
Mean (range)	3.0	(3)	3.0	(3)	3.0	(3)

Findings were graded as follows.

Pupillary reflex

1: Normal pupillary contraction observed, 2: pupils completely dilated, 3: pupils completely contracted.

Approaching behavior

1: Not observed, 2: approaching and sniffing stimulus, 3: reacting to stimulus, including vocalizing,
4: jumping at or biting at stimulus.

Response to touch

1: No response, 2: looking back and leaving stimulus, 3: reacting to stimulus, including vocalizing,
4: jumping at or biting at stimulus.

Auditory reflex

1: Not observed, 2: hesitating at stimulus or moving ears, 3: jumping at and trying to bite at the source of sound.

Pain reflex

1: Not observed, 2: slowly looking back or slowly moving forward to escape from stimulus,
3: quickly moving forward to escape from stimulus or biting at it immediately after looking back,
4: jumping forward to escape from stimulus, 5: loudly vocalizing and biting at stimulus after suddenly looking back.

Table 21 Grip strength of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control		bumetizole		
	mg/kg	0	62.5	250	1000
Number of males		6	6	6	6
Forelimb		1029 ± 325	1122 ± 255	1120 ± 301	954 ± 252
Hindlimb		118 ± 44	148 ± 103	137 ± 58	117 ± 40

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 22 Grip strength of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control		bumetizole		
	mg/kg	0	62.5	250	1000
Number of females	6	6	6	6	6
Forelimb					
Hindlimb					
	959 ± 185		791 ± 90	799 ± 145	860 ± 240
	121 ± 48		93 ± 41	74 ± 18	118 ± 58

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 23 Spontaneous motor activity of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control		bumetizole			
	mg/kg	0	62.5	250	1000	
Number of males	6		6		6	
Ambulatory counts						
Minutes after administration	10	1188 ± 561	1044 ± 517	878 ± 436	678 ± 325	
	20	395 ± 386	1168 ± 2109	328 ± 261	871 ± 1568	
	30	127 ± 120	467 ± 792	260 ± 239	238 ± 292	
	40	181 ± 240	188 ± 166	191 ± 233	156 ± 288	
	50	59 ± 95	151 ± 182	108 ± 108	190 ± 327	
	60	204 ± 239	169 ± 273	2 ± 4 *	152 ± 273	
	Total	2153 ± 825	3187 ± 3493	1765 ± 1020	2285 ± 3007	
Vertical counts						
Minutes after administration	10	62 ± 20	59 ± 28	58 ± 12	40 ± 18	
	20	22 ± 14	23 ± 17	28 ± 18	15 ± 10	
	30	7 ± 9	17 ± 23	15 ± 12	6 ± 8	
	40	10 ± 13	10 ± 14	12 ± 16	2 ± 2	
	50	6 ± 12	4 ± 5	6 ± 7	2 ± 6	
	60	11 ± 13	5 ± 7	0 ± 0 *	2 ± 3	
	Total	118 ± 64	118 ± 77	119 ± 37	66 ± 33	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 24 Spontaneous motor activity of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole			
	0	62.5	250	1000		
Number of females	6	6	6	6		
Ambulatory counts						
Minutes after administration						
10	1015 ± 496	922 ± 301	891 ± 450	1222 ± 1334		
20	331 ± 500	262 ± 363	329 ± 472	1600 ± 2466		
30	73 ± 156	75 ± 180	192 ± 298	850 ± 1599		
40	107 ± 179	67 ± 161	164 ± 224	726 ± 1256		
50	68 ± 125	35 ± 80	964 ± 2065	656 ± 1255		
60	9 ± 22	94 ± 227	52 ± 123	685 ± 1259		
Total	1604 ± 1068	1455 ± 1246	2592 ± 2969	5740 ± 9110		
Vertical counts						
Minutes after administration						
10	30 ± 9	42 ± 26	27 ± 15	38 ± 36		
20	9 ± 12	9 ± 12	11 ± 13	98 ± 215		
30	5 ± 12	2 ± 5	7 ± 11	10 ± 18		
40	3 ± 5	2 ± 4	6 ± 11	2 ± 4		
50	2 ± 3	1 ± 2	4 ± 6	1 ± 2		
60	0 ± 0	2 ± 6	2 ± 4	0 ± 0		
Total	48 ± 31	58 ± 43	57 ± 53	149 ± 265		

Each value shows mean ± S.D.

Table 25-1 Urinary examination of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control		bumetizole		
	mg/kg	0	62.5	250	1000
Number of males		6	6	6	6
Volume (mL): Mean ± S.D.		17.0 ± 4.8	23.3 ± 7.5	17.2 ± 4.4	14.6 ± 3.7
Specific gravity: Mean ± S.D.		1.044 ± 0.005	1.032 ± 0.010	1.047 ± 0.008	1.054 ± 0.014
Color					
Light yellow		6	6	6	6
pH					
8.5		6	6	3	6
9.0		0	0	3	0
Protein					
10~20 mg/dL		1	1	0	0
30 mg/dL		4	4	4	2
100 mg/dL		1	1	2	4
Glucose					
Negative		6	6	6	6
Ketone body					
Negative		6	5	5	4
Slight		0	1	1	2
Bilirubin					
Negative		6	6	6	6
Occult blood					
Negative		4	5	5	3
Trace		2	1	0	3
Slight		0	0	1	0
Urobilinogen					
Normal		6	6	6	5
1 mg/dL		0	0	0	1

Table 25-2 Urinary examination of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control	bumetizole		
		62.5	250	1000
Number of males	6	6	6	6
Urinary sediments				
Epithelial cells				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Erythrocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Leukocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Casts				
Not observed	6	6	6	6
Crystals				
Not observed	4	3	4	3
Observed	2	3	2	3

Table 26-1 Urinary examination of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control		bumetizole		
	mg/kg	0	62.5	250	1000
Number of females		6	6	6	6
Volume (mL): Mean ± S.D.		29.9 ± 3.8	24.2 ± 3.9	28.2 ± 6.8	35.9 ± 9.9
Specific gravity: Mean ± S.D.		1.032 ± 0.005	1.036 ± 0.005	1.033 ± 0.005	1.027 ± 0.005
Color					
Light yellow		6	6	6	6
pH					
5.5		0	2	1	0
6.0		1	0	0	0
6.5		3	2	0	3
7.0		0	0	3	1
7.5		1	2	0	2
8.0		1	0	1	0
8.5		0	0	1	0
Protein					
Negative		2	3	5	6
10~20 mg/dL		4	1	0	0
30 mg/dL		0	1	1	0
100 mg/dL		0	1	0	0
Glucose					
Negative		6	6	6	6
Ketone body					
Negative		6	6	5	6
Slight		0	0	1	0
Bilirubin					
Negative		6	6	6	6
Occult blood					
Negative		6	6	6	6
Urobilinogen					
Normal		6	5	5	6
1 mg/dL		0	1	1	0

Table 26-2 Urinary examination of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control	bumetizole		
		62.5	250	1000
Number of females	6	6	6	6
Urinary sediments				
Epithelial cells				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Erythrocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Leukocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Casts				
Not observed	6	6	6	6
Crystals				
Not observed	1	3	2	1
Observed	5	3	4	5

Table 27-1 Urinary examination of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control		bumetizole			
	mg/kg	0	62.5	250	1000	
Number of males			6	6	6	6
Volume (mL): Mean ± S.D.	20.0	± 9.2	19.8	± 6.5	15.2	± 5.4
Specific gravity: Mean ± S.D.	1.043	± 0.020	1.042	± 0.011	1.052	± 0.015
Color						
Light yellow	6		6		6	
pH						
7.5	0		0		1	
8.0	0		0		1	
8.5	6		6		3	
9.0	0		0		1	
Protein						
10~20 mg/dL	0		1		0	
30 mg/dL	3		2		4	
100 mg/dL	3		3		2	
Glucose						
Negative	6		6		6	
Ketone body						
Negative	6		6		6	
Slight	0		0		0	
Bilirubin						
Negative	6		6		6	
Occult blood						
Negative	5		5		6	
Trace	1		1		0	
Urobilinogen						
Normal	6		6		6	

Table 27-2 Urinary examination of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control	bumetizole		
		62.5	250	1000
mg/kg	0	62.5	250	1000
Number of males	6	6	6	6
Urinary sediments				
Epithelial cells				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Erythrocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Leukocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Casts				
Not observed	6	6	6	6
Crystals				
Not observed	4	4	4	3
Observed	2	2	2	3

Table 28-1 Urinary examination of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control		bumetizole	
	mg/kg	0	250	1000
Number of females		6	6	6
Volume (mL): Mean ± S.D.	12.4 ± 4.1		13.3 ± 3.1	10.0 ± 3.4
Specific gravity: Mean ± S.D.	1.050 ± 0.013		1.046 ± 0.005	1.058 ± 0.009
Color				
Light yellow		6	6	6
pH				
7.0		0	0	1
8.5		5	4	2
9.0		1	2	3
Protein				
Negative		3	3	3
10~20 mg/dL		2	2	3
30 mg/dL		1	1	0
Glucose				
Negative		6	6	6
Ketone body				
Negative		6	6	6
Bilirubin				
Negative		6	6	6
Occult blood				
Negative		5	5	6
Trace		1	1	0
Urobilinogen				
Normal		6	6	6

Table 28-2 Urinary examination of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control	bumetizole	
		250	1000
Number of females	6	6	6
Urinary sediments			
Epithelial cells			
0~20 cells/100 fields	6	6	6
Erythrocytes			
0~20 cells/100 fields	6	6	6
Leukocytes			
0~20 cells/100 fields	6	6	6
Casts			
Not observed	6	6	6
Crystals			
Not observed	2	3	3
Observed	4	3	3

Table 29 Hematological examination of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole			
	0	62.5	250	1000		
Number of males	6	6	6	6		
RBC (10 ⁴ /µL)	866 ± 45	874 ± 30	850 ± 19	861 ± 57		
HGB (g/dL)	15.9 ± 0.5	16.1 ± 0.5	16.2 ± 0.4	15.9 ± 0.8		
HCT (%)	46.8 ± 1.9	47.5 ± 1.8	47.4 ± 0.8	46.7 ± 2.4		
MCV (fL)	54.1 ± 1.4	54.3 ± 1.4	55.8 ± 1.0	54.3 ± 1.4		
MCH (pg)	18.4 ± 0.7	18.4 ± 0.5	19.1 ± 0.5	18.5 ± 0.6		
MCHC (g/dL)	33.9 ± 0.5	33.9 ± 0.5	34.3 ± 0.5	34.1 ± 0.2		
PLT (10 ⁴ /µL)	97.8 ± 10.3	97.3 ± 11.1	99.7 ± 13.4	94.0 ± 3.9		
RET (‰)	29 ± 1	34 ± 5	32 ± 5	29 ± 4		
PT (sec.)	19.8 ± 2.7	21.6 ± 3.3	20.1 ± 3.0	19.7 ± 4.2		
APTT (sec.)	22.9 ± 1.3	23.9 ± 2.5	23.1 ± 1.4	23.5 ± 3.8		
Fbg (mg/dL)	208.1 ± 14.7	210.4 ± 9.4	209.9 ± 6.6	196.3 ± 6.3		
WBC (10 ² /µL)	56 ± 12	60 ± 10	59 ± 19	64 ± 11		
Differential leukocyte (%)						
Lymphocyte	86.2 ± 3.0	87.3 ± 4.6	87.8 ± 3.5	87.5 ± 3.9		
Neutrophil	13.0 ± 3.5	11.5 ± 3.6	11.7 ± 3.7	11.3 ± 4.0		
Eosinophil	0.7 ± 0.8	0.7 ± 1.0	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.8		
Basophil	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
Monocyte	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.7 ± 0.5		

Each value shows mean ± S.D.

Table 30 Hematological examination of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole			
	0	62.5	250	1000		
Number of females	6	6	6	6		
RBC	($10^4/\mu\text{L}$)	722 ± 36	687 ± 34	719 ± 27	721 ± 38	
HGB	(g/dL)	14.7 ± 0.4	14.2 ± 0.5	14.1 ± 0.7	14.6 ± 0.8	
HCT	(%)	42.0 ± 1.3	40.2 ± 2.2	41.1 ± 1.7	42.0 ± 2.3	
MCV	(fL)	58.3 ± 1.7	58.5 ± 2.1	57.2 ± 1.1	58.3 ± 1.5	
MCH	(pg)	20.4 ± 0.7	20.6 ± 0.6	19.6 ± 0.3	20.2 ± 0.4	
MCHC	(g/dL)	34.9 ± 0.7	35.3 ± 1.0	34.2 ± 0.7	34.7 ± 0.5	
PLT	($10^4/\mu\text{L}$)	109.3 ± 7.1	89.7 ± 12.1 **	95.0 ± 9.6 *	96.3 ± 7.4	
RET	(%)	59 ± 11	59 ± 7	68 ± 8	68 ± 14	
PT	(sec.)	15.9 ± 0.6	16.2 ± 0.4	16.1 ± 0.4	16.0 ± 0.8	
APTT	(sec.)	16.6 ± 0.7	16.8 ± 1.2	17.1 ± 0.8	17.1 ± 0.9	
Fbg	(mg/dL)	224.3 ± 23.4	211.6 ± 33.7	214.8 ± 31.7	212.8 ± 20.9	
WBC	($10^3/\mu\text{L}$)	46 ± 14	39 ± 10	43 ± 7	39 ± 7	
Differential leukocyte (%)						
Lymphocyte		84.0 ± 3.5	85.0 ± 7.2	83.7 ± 6.1	86.2 ± 2.9	
Neutrophil		14.3 ± 4.6	13.8 ± 6.5	15.2 ± 4.9	12.2 ± 2.5	
Eosinophil		0.8 ± 1.0	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.5	1.0 ± 0.9	
Basophil		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Monocyte		0.8 ± 0.8	0.8 ± 0.8	0.8 ± 1.0	0.7 ± 0.5	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 31 Hematological examination of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole			
	0	62.5	250	1000		
Number of males	6	6	6	6		
RBC	(10 ⁶ /µL)	868 ± 33	841 ± 39	859 ± 24	846 ± 44	
HGB	(g/dL)	15.9 ± 0.4	15.5 ± 0.8	15.8 ± 0.6	15.4 ± 0.7	
HCT	(%)	46.8 ± 1.3	45.6 ± 2.0	46.9 ± 1.8	45.8 ± 2.4	
MCV	(fL)	53.9 ± 0.7	54.3 ± 1.9	54.6 ± 1.1	54.2 ± 1.7	
MCH	(pg)	18.3 ± 0.4	18.5 ± 1.0	18.4 ± 0.4	18.2 ± 0.7	
MCHC	(g/dL)	33.9 ± 0.5	34.0 ± 0.6	33.7 ± 0.3	33.6 ± 0.5	
PLT	(10 ³ /µL)	99.3 ± 8.8	102.0 ± 9.3	104.3 ± 10.3	100.0 ± 13.2	
RET	(%)	28 ± 4	27 ± 4	33 ± 8	29 ± 7	
PT	(sec.)	19.4 ± 2.2	17.4 ± 1.5	18.3 ± 1.7	20.0 ± 1.2	
APTT	(sec.)	22.2 ± 2.7	21.9 ± 1.0	21.9 ± 1.1	23.0 ± 1.0	
Fbg	(mg/dL)	199.1 ± 10.1	195.9 ± 11.6	190.2 ± 13.1	186.8 ± 9.9	
WBC	(10 ³ /µL)	58 ± 11	61 ± 12	63 ± 18	61 ± 12	
Differential leukocyte (%)						
Lymphocyte		88.7 ± 3.2	86.5 ± 4.6	87.0 ± 6.4	87.8 ± 4.4	
Neutrophil		10.2 ± 2.6	12.0 ± 5.0	11.8 ± 6.0	10.5 ± 3.6	
Eosinophil		0.5 ± 0.5	0.7 ± 0.5	0.7 ± 0.8	0.8 ± 1.0	
Basophil		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Monocyte		0.7 ± 0.5	0.8 ± 0.8	0.5 ± 0.5	0.8 ± 0.8	

Each value shows mean ± S.D.

Table 32 Hematological examination of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0		250	1000	
Number of females	6		6	6	
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	761 ± 19		743 ± 38	760 ± 25	
HGB (g/dL)	15.0 ± 0.5		14.6 ± 0.7	14.8 ± 0.5	
HCT (%)	43.3 ± 1.2		41.2 ± 1.9	42.7 ± 1.5	
MCV (fL)	56.9 ± 1.4		55.4 ± 1.4	56.3 ± 0.7	
MCH (pg)	19.7 ± 0.5		19.7 ± 0.7	19.5 ± 0.3	
MCHC (g/dL)	34.6 ± 0.4		35.5 ± 0.3 **	34.7 ± 0.3	
PLT ($10^4/\mu\text{L}$)	94.5 ± 19.0		94.8 ± 3.8	92.9 ± 9.7	
RET (%)	27 ± 6		27 ± 5	26 ± 4	
PT (sec.)	15.2 ± 1.1		15.1 ± 0.4	15.2 ± 0.3	
APTT (sec.)	17.9 ± 1.2		17.3 ± 1.2	17.0 ± 1.0	
Fbg (mg/dL)	159.3 ± 8.6		162.8 ± 5.7	163.9 ± 5.8	
WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	31 ± 6		33 ± 11	33 ± 8	
Differential leukocyte (%)					
Lymphocyte	83.8 ± 3.9		86.3 ± 4.3	89.5 ± 3.2 *	
Neutrophil	15.2 ± 4.4		12.2 ± 4.2	9.2 ± 3.5 *	
Eosinophil	0.2 ± 0.4		0.8 ± 0.4	0.8 ± 1.0	
Basophil	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Monocyte	0.8 ± 0.8		0.7 ± 0.5	0.5 ± 0.5	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 33 Blood chemical examination of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of males	6	6	6	6	
AST (IU/L)	79.2 ± 11.8	82.5 ± 8.1	83.2 ± 11.2	91.1 ± 22.5	
ALT (IU/L)	22.0 ± 5.0	23.9 ± 4.3	23.1 ± 6.8	27.9 ± 11.0	
ALP (IU/L)	329.4 ± 69.2	370.4 ± 47.8	380.3 ± 79.4	339.6 ± 52.3	
γ-GTP (IU/L)	0.36 ± 0.22	0.30 ± 0.12	0.32 ± 0.25	0.46 ± 0.21	
TP (g/dL)	5.72 ± 0.16	5.41 ± 0.26 *	5.52 ± 0.16	5.49 ± 0.19	
Alb (g/dL)	2.84 ± 0.13	2.76 ± 0.15	2.86 ± 0.13	2.82 ± 0.14	
A/G	0.99 ± 0.06	1.05 ± 0.08	1.08 ± 0.07	1.05 ± 0.04	
T-Bil (mg/dL)	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01 *	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01 *	
UN (mg/dL)	18.4 ± 1.6	18.0 ± 1.5	17.7 ± 2.1	18.2 ± 1.2	
CRE (mg/dL)	0.30 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.02	
Glu (mg/dL)	115.1 ± 7.2	116.2 ± 6.0	117.0 ± 15.1	119.2 ± 13.0	
T-Chol (mg/dL)	57.9 ± 13.3	51.5 ± 13.0	55.9 ± 11.5	54.0 ± 13.2	
TG (mg/dL)	39.7 ± 14.7	36.3 ± 11.7	41.2 ± 17.0	54.6 ± 29.1	
Na (mEq/L)	144.5 ± 1.2	145.9 ± 0.5	145.2 ± 0.8	145.1 ± 1.2	
K (mEq/L)	4.32 ± 0.23	4.42 ± 0.16	4.26 ± 0.21	4.23 ± 0.12	
Cl (mEq/L)	105.6 ± 1.1	107.0 ± 0.4 *	106.4 ± 0.8	106.2 ± 0.7	
Ca (mg/dL)	9.7 ± 0.2	9.5 ± 0.2	9.6 ± 0.1	9.6 ± 0.3	
IP (mg/dL)	7.2 ± 0.7	7.3 ± 0.7	7.5 ± 0.5	7.5 ± 0.8	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 34 Blood chemical examination of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole			
	0	62.5	250	1000		
Number of females	6	6	6	6		
AST (IU/L)	85.4 ± 12.0	80.3 ± 10.0	78.8 ± 6.2	79.3 ± 10.6		
ALT (IU/L)	17.6 ± 2.5	19.8 ± 6.6	16.1 ± 1.9	19.3 ± 4.3		
ALP (IU/L)	134.8 ± 15.7	182.7 ± 41.4	150.4 ± 47.1	165.6 ± 23.3		
γ-GTP (IU/L)	0.55 ± 0.16	0.57 ± 0.15	0.50 ± 0.17	0.55 ± 0.16		
TP (g/dL)	5.98 ± 0.30	6.21 ± 0.24	6.11 ± 0.33	6.15 ± 0.22		
Alb (g/dL)	2.99 ± 0.28	3.10 ± 0.23	3.07 ± 0.19	3.10 ± 0.24		
A/G	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.09		
T-Bil (mg/dL)	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01		
UN (mg/dL)	23.5 ± 2.8	23.2 ± 1.3	23.5 ± 3.7	20.5 ± 3.2		
CRE (mg/dL)	0.40 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.39 ± 0.02		
Glu (mg/dL)	111.9 ± 9.8	117.8 ± 5.5	109.8 ± 5.0	121.7 ± 7.9		
T-Cho (mg/dL)	71.0 ± 4.8	77.5 ± 13.4	82.3 ± 24.6	80.5 ± 15.2		
TG (mg/dL)	30.7 ± 6.8	31.9 ± 11.6	34.8 ± 23.4	34.3 ± 14.6		
Na (mEq/L)	139.4 ± 0.5	139.9 ± 1.3	140.2 ± 1.5	140.3 ± 0.5		
K (mEq/L)	4.27 ± 0.23	4.05 ± 0.20	4.26 ± 0.24	4.16 ± 0.30		
Cl (mEq/L)	103.7 ± 1.8	103.6 ± 2.6	104.2 ± 1.4	104.0 ± 1.2		
Ca (mg/dL)	10.3 ± 0.1	10.4 ± 0.3	10.3 ± 0.5	10.4 ± 0.3		
IP (mg/dL)	6.5 ± 0.4	6.8 ± 0.6	7.0 ± 0.7	6.6 ± 0.9		

Each value shows mean ± S.D.

Table 35 Blood chemical examination of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of males	6	6	6	6	
AST (IU/L)	82.4 ± 12.3	78.2 ± 8.4	79.5 ± 4.1	83.5 ± 9.3	
ALT (IU/L)	32.2 ± 3.8	31.4 ± 3.9	32.4 ± 3.4	33.9 ± 4.8	
ALP (IU/L)	287.5 ± 41.7	275.2 ± 37.1	313.2 ± 36.2	311.2 ± 40.9	
γ-GTP (IU/L)	0.46 ± 0.18	0.33 ± 0.15	0.39 ± 0.08	0.37 ± 0.11	
TP (g/dL)	5.45 ± 0.19	5.45 ± 0.30	5.41 ± 0.26	5.34 ± 0.20	
Alb (g/dL)	2.72 ± 0.14	2.67 ± 0.13	2.71 ± 0.03	2.68 ± 0.17	
A/G	1.00 ± 0.08	0.96 ± 0.07	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.10	
T-Bil (mg/dL)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	
UN (mg/dL)	18.7 ± 2.9	17.5 ± 1.4	19.0 ± 2.2	18.6 ± 2.0	
CRE (mg/dL)	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.03	
Glu (mg/dL)	124.4 ± 12.7	116.8 ± 7.9	119.9 ± 18.8	119.4 ± 14.3	
T-Chol (mg/dL)	56.1 ± 6.1	53.7 ± 3.4	59.0 ± 10.5	44.9 ± 13.3	
TG (mg/dL)	47.9 ± 20.7	43.1 ± 14.6	48.4 ± 14.4	38.4 ± 13.2	
Na (mEq/L)	144.4 ± 1.3	145.1 ± 1.3	144.3 ± 0.9	144.6 ± 1.2	
K (mEq/L)	4.34 ± 0.30	4.46 ± 0.22	4.45 ± 0.18	4.56 ± 0.18	
Cl (mEq/L)	105.4 ± 1.1	105.4 ± 1.0	105.5 ± 1.2	105.8 ± 0.9	
Ca (mg/dL)	9.5 ± 0.3	9.5 ± 0.3	9.4 ± 0.3	9.4 ± 0.3	
IP (mg/dL)	6.7 ± 1.2	6.8 ± 0.6	6.5 ± 0.5	6.8 ± 0.5	

Each value shows mean ± S.D.

Table 36 Blood chemical examination of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole	
	0	250	1000	6
Number of females	6	6	6	
AST (IU/L)	71.2 ± 11.5	76.9 ± 13.4	75.5 ± 7.0	
ALT (IU/L)	26.8 ± 4.5	27.2 ± 10.4	27.8 ± 5.6	
ALP (IU/L)	147.9 ± 31.8	142.1 ± 24.4	122.4 ± 15.7	
γ-GTP (IU/L)	0.58 ± 0.31	0.58 ± 0.11	0.52 ± 0.18	
TP (g/dL)	6.37 ± 0.39	6.26 ± 0.49	6.25 ± 0.38	
Alb (g/dL)	3.58 ± 0.29	3.45 ± 0.36	3.56 ± 0.29	
A/G	1.29 ± 0.11	1.23 ± 0.11	1.33 ± 0.12	
T-Bil (mg/dL)	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02	
UN (mg/dL)	17.7 ± 2.8	20.1 ± 2.9	19.2 ± 4.3	
CRE (mg/dL)	0.39 ± 0.08	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.03	
Glu (mg/dL)	125.0 ± 14.0	123.9 ± 6.1	115.4 ± 8.1	
T-Chol (mg/dL)	77.3 ± 18.5	70.8 ± 8.5	70.0 ± 9.9	
TG (mg/dL)	35.4 ± 10.2	29.2 ± 15.6	23.9 ± 12.0	
Na (mEq/L)	142.5 ± 0.6	142.6 ± 1.2	143.3 ± 1.4	
K (mEq/L)	4.12 ± 0.09	4.20 ± 0.21	4.20 ± 0.25	
Cl (mEq/L)	106.5 ± 0.6	106.7 ± 0.5	107.1 ± 1.5	
Ca (mg/dL)	9.8 ± 0.4	9.6 ± 0.3	9.9 ± 0.3	
IP (mg/dL)	5.1 ± 1.0	5.5 ± 1.7	5.8 ± 1.2	

Each value shows mean ± S.D.

Table 37 Necropsy findings of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control	bumetizole		
		62.5	250	1000
Number of males	6	6	6	6
Normal	5	6	6	6
Epididymis				
Yellowish white nodule, left cauda	1	0	0	0

Table 38 Necropsy findings of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control				bumetizole			
	0	62.5	250	1000				
Number of dams	11	12	12	11				
Normal	11	12	12	11				
Number of non-pregnant females	1	0	0	1				
Normal	1	-	-	1				

Table 39 Necropsy findings of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control	bumetizole		
		62.5	250	1000
Number of males	6	6	6	6
Normal	6	6	6	6

Table 40 Necropsy findings of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control	bumetizole	
		250	1000
Number of females	6	6	6
Normal	6	6	6

Table 41 Organ weights of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole	
	0	62.5	250	1000
Number of males	6	6	6	6
Body weight (g)	459 ± 29	461 ± 25	457 ± 13	461 ± 16
Brain (g)	2.11 ± 0.10	2.12 ± 0.10	2.13 ± 0.05	2.06 ± 0.08
(g%)	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.45 ± 0.02
Pituitary (mg)	14.4 ± 1.7	13.0 ± 2.2	12.6 ± 0.7	12.4 ± 1.9
(mg%)	3.2 ± 0.3	2.8 ± 0.5	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.4
Thyroids (mg)	21.4 ± 4.7	22.7 ± 2.6	20.7 ± 3.9	19.0 ± 2.4
(mg%)	4.7 ± 0.9	4.9 ± 0.6	4.6 ± 0.9	4.1 ± 0.5
Thymus (mg)	244 ± 50	285 ± 103	228 ± 41	216 ± 79
(mg%)	53 ± 9	61 ± 19	50 ± 10	47 ± 17
Heart (g)	1.37 ± 0.11	1.52 ± 0.16	1.39 ± 0.08	1.47 ± 0.09
(g%)	0.30 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.02
Liver (g)	11.17 ± 0.71	11.38 ± 1.06	11.23 ± 0.94	11.44 ± 0.68
(g%)	2.44 ± 0.13	2.47 ± 0.12	2.45 ± 0.15	2.48 ± 0.14
Spleen (g)	0.72 ± 0.08	0.71 ± 0.13	0.77 ± 0.10	0.67 ± 0.10
(g%)	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.02
Kidneys (g)	2.97 ± 0.26	2.86 ± 0.16	2.98 ± 0.17	3.00 ± 0.28
(g%)	0.65 ± 0.05	0.62 ± 0.04	0.65 ± 0.03	0.65 ± 0.06
Adrenals (mg)	63.5 ± 7.4	62.1 ± 8.9	59.3 ± 13.8	64.3 ± 7.6
(mg%)	13.9 ± 1.2	13.5 ± 1.8	13.0 ± 3.0	14.0 ± 1.7
Testes (g)	3.33 ± 0.25	3.31 ± 0.37	3.47 ± 0.08	3.23 ± 0.34
(g%)	0.73 ± 0.04	0.72 ± 0.06	0.76 ± 0.03	0.70 ± 0.06
Epididymides (g)	1.29 ± 0.09	1.26 ± 0.12	1.29 ± 0.12	1.20 ± 0.07
(g%)	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.02

Each value shows mean ± S.D.

Table 42 Organ weights of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control				bumetizole			
	0	62.5	250	1000				
Number of females	11	12	12	11				
Body weight (g)	307 ± 20	304 ± 21	303 ± 25	300 ± 28				
Brain (g)	1.97 ± 0.08	1.97 ± 0.06	2.01 ± 0.10	1.97 ± 0.09				
(g%)	0.64 ± 0.04	0.65 ± 0.03	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.07				
Pituitary (mg)	18.2 ± 2.2	17.9 ± 3.0	18.0 ± 1.7	16.4 ± 1.6				
(mg%)	6.0 ± 0.7	5.9 ± 0.9	6.0 ± 0.6	5.5 ± 0.8				
Thyroids (mg)	18.3 ± 2.2	18.1 ± 3.7	18.0 ± 1.9	17.9 ± 2.5				
(mg%)	6.0 ± 0.8	6.0 ± 1.2	6.0 ± 0.7	6.0 ± 0.8				
Thymus (mg)	270 ± 84	327 ± 63	267 ± 56	266 ± 60				
(mg%)	87 ± 24	107 ± 19 *	88 ± 15	89 ± 19				
Heart (g)	1.04 ± 0.11	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	1.03 ± 0.08				
(g%)	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.03				
Liver (g)	9.29 ± 0.77	9.70 ± 1.19	9.95 ± 1.33	9.77 ± 0.89				
(g%)	3.03 ± 0.20	3.18 ± 0.21	3.28 ± 0.37	3.26 ± 0.25				
Spleen (g)	0.68 ± 0.12	0.74 ± 0.11	0.75 ± 0.11	0.70 ± 0.08				
(g%)	0.22 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.03				
Kidneys (g)	2.00 ± 0.14	2.05 ± 0.15	2.05 ± 0.19	2.03 ± 0.16				
(g%)	0.65 ± 0.04	0.67 ± 0.04	0.68 ± 0.06	0.68 ± 0.07				
Adrenals (mg)	76.6 ± 11.5	75.6 ± 5.8	77.4 ± 11.8	75.6 ± 10.2				
(mg%)	25.0 ± 3.8	24.9 ± 1.8	25.6 ± 3.5	25.3 ± 3.2				
Ovaries (mg)	98.7 ± 13.9	94.2 ± 11.0	99.9 ± 9.6	103.5 ± 9.8				
(mg%)	32.2 ± 4.1	31.0 ± 3.2	33.1 ± 3.9	34.7 ± 3.4				
Uterus (g)	0.54 ± 0.10	0.59 ± 0.14	0.57 ± 0.04	0.56 ± 0.10				
(g%)	0.18 ± 0.04	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.04				

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 43 Organ weights of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control				bumetizole			
	0	62.5	250	1000				
Number of males	6	6	6	6				
Body weight (g)	504 ± 30	508 ± 27	494 ± 37	490 ± 33				
Brain (g)	2.12 ± 0.05	2.10 ± 0.08	2.08 ± 0.08	2.13 ± 0.06				
(g%)	0.42 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.44 ± 0.03				
Pituitary (mg)	13.6 ± 1.2	15.0 ± 1.6	13.5 ± 1.7	13.8 ± 0.5				
(mg%)	2.7 ± 0.2	3.0 ± 0.4	2.7 ± 0.3	2.9 ± 0.1				
Thyroids (mg)	20.7 ± 3.8	25.5 ± 4.2	21.4 ± 4.6	20.8 ± 1.9				
(mg%)	4.1 ± 0.9	5.0 ± 0.7	4.3 ± 0.9	4.3 ± 0.5				
Thymus (mg)	262 ± 77	257 ± 55	276 ± 59	270 ± 54				
(mg%)	52 ± 15	51 ± 12	56 ± 10	55 ± 11				
Heart (g)	1.55 ± 0.16	1.47 ± 0.17	1.45 ± 0.15	1.44 ± 0.10				
(g%)	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.02				
Liver (g)	12.18 ± 0.91	12.43 ± 0.90	11.99 ± 1.60	12.42 ± 1.39				
(g%)	2.42 ± 0.09	2.45 ± 0.09	2.42 ± 0.16	2.53 ± 0.16				
Spleen (g)	0.79 ± 0.11	0.77 ± 0.07	0.77 ± 0.13	0.77 ± 0.10				
(g%)	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02				
Kidneys (g)	2.96 ± 0.23	3.10 ± 0.23	2.85 ± 0.26	3.04 ± 0.16				
(g%)	0.59 ± 0.05	0.61 ± 0.06	0.58 ± 0.02	0.62 ± 0.01				
Adrenals (mg)	59.1 ± 5.3	57.1 ± 9.5	53.1 ± 8.0	56.4 ± 4.2				
(mg%)	11.8 ± 1.4	11.3 ± 1.9	10.7 ± 1.3	11.6 ± 1.3				
Testes (g)	3.24 ± 0.11	3.36 ± 0.46	3.59 ± 0.35	3.31 ± 0.21				
(g%)	0.65 ± 0.04	0.66 ± 0.11	0.73 ± 0.09	0.68 ± 0.07				
Epididymides (g)	1.31 ± 0.10	1.30 ± 0.05	1.36 ± 0.14	1.33 ± 0.10				
(g%)	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.03				

Each value shows mean ± S.D.

Table 44 Organ weights of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control			bumetizole		
	0	250	1000	6	6	6
Number of females	6	6	6			
Body weight (g)	316 ± 24	323 ± 25	303 ± 8			
Brain (g)	1.98 ± 0.07	2.02 ± 0.14	2.01 ± 0.06			
(g%)	0.63 ± 0.05	0.63 ± 0.08	0.67 ± 0.01			
Pituitary (mg)	17.0 ± 2.6	18.2 ± 1.6	18.7 ± 2.8			
(mg%)	5.4 ± 1.1	5.7 ± 0.7	6.2 ± 0.8			
Thyroids (mg)	19.0 ± 3.7	19.2 ± 5.7	17.7 ± 3.7			
(mg%)	6.1 ± 1.2	5.9 ± 1.5	5.8 ± 1.2			
Thymus (mg)	303 ± 43	326 ± 60	282 ± 40			
(mg%)	96 ± 14	101 ± 18	93 ± 12			
Heart (g)	0.97 ± 0.07	0.97 ± 0.11	0.98 ± 0.05			
(g%)	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.33 ± 0.02			
Liver (g)	7.81 ± 0.68	7.58 ± 0.66	7.45 ± 0.32			
(g%)	2.47 ± 0.10	2.35 ± 0.12	2.46 ± 0.11			
Spleen (g)	0.56 ± 0.09	0.57 ± 0.09	0.59 ± 0.09			
(g%)	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.03			
Kidneys (g)	1.93 ± 0.10	1.88 ± 0.11	1.93 ± 0.11			
(g%)	0.61 ± 0.05	0.59 ± 0.04	0.64 ± 0.04			
Adrenals (mg)	72.0 ± 9.5	66.0 ± 6.8	71.2 ± 2.9			
(mg%)	22.8 ± 1.8	20.6 ± 2.4	23.5 ± 1.3			
Ovaries (mg)	85.8 ± 9.7	74.1 ± 5.9 *	79.9 ± 7.6			
(mg%)	27.2 ± 2.5	23.1 ± 2.3 *	26.4 ± 2.7			
Uterus (g)	0.54 ± 0.18	0.62 ± 0.16	0.60 ± 0.12			
(g%)	0.17 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.04			

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 45 Histopathological findings of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control						bumetizole					
	0						1000					
	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+
Findings												
Heart	[6] ^{c)}						[6]					
Lung												
Accumulation, foam cell	4	2	2	0	0	0	5	1	1	0	0	0
Trachea	[6]						[6]					
Liver	[6]						[6]					
Pancreas	[6]						[6]					
Sublingual gland	[6]						[6]					
Submandibular gland	[6]						[6]					
Esophagus	[6]						[6]					
Stomach	[6]						[6]					
Duodenum	[6]						[6]					
Jejunum	[6]						[6]					
Mineralization, Peyer's patch	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0
Ileum	[6]						[6]					
Cecum	[6]						[6]					
Colon	[6]						[6]					
Rectum	[6]						[6]					
Thymus	[6]						[6]					
Spleen	[6]						[6]					
Submandibular lymph node	[6]						[6]					
Mesenteric lymph node	[6]						[6]					
Kidney	[6]						[6]					
Urinary bladder	[6]						[6]					
Testis	[6]						[6]					
Epididymis	[6]						[6]					
Cellular infiltration, lymphoid cell	5	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Granuloma, spermatic, lateral	5	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Seminal vesicle	[6]						[6]					
Prostate	[6]						[6]					
Cellular infiltration, lymphoid cell	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0
Pituitary	[6]						[6]					
Adrenal	[6]						[6]					
Thyroid	[6]						[6]					
Parathyroid	[6]						[6]					
Cerebrum	[6]						[6]					
Cerebellum	[6]						[6]					
Medulla oblongata	[6]						[6]					
Spinal code	[6]						[6]					
Sciatic nerve	[6]						[6]					
Eyeball	[6]						[6]					
Harderian gland	[6]						[6]					
Bone marrow (sternum or femur)	[6]						[6]					
Bone (sternum or femur)	[6]						[6]					

a): No abnormality detected.

b): Abnormality detected.

c): Number in brackets is number of males examined.

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Table 46 Histopathological findings of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control						bumetizole					
	0						1000					
	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+
Findings												
Heart	[6] ^{c)}											
Lung	[6]						[6]					
Trachea	[6]						[6]					
Liver	[6]						[6]					
Pancreas	[6]						[6]					
Sublingual gland	[6]						[6]					
Submandibular gland	[6]						[6]					
Esophagus	[6]						[6]					
Stomach	[6]						[6]					
Duodenum	[6]						[6]					
Jejunum	[6]						[6]					
Mineralization, Peyer's patch	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0
Ileum	[6]						[6]					
Cecum	[6]						[6]					
Colon	[6]						[6]					
Rectum	[6]						[6]					
Thymus	[6]						[6]					
Spleen	[6]						[6]					
Hematopoiesis, extramedullary	3	3	3	0	0	0	5	1	1	0	0	0
Submandibular lymph node	[6]						[6]					
Mesenteric lymph node	[6]						[6]					
Kidney	[6]						[6]					
Urinary bladder	[6]						[6]					
Ovary	[6]						[6]					
Uterus	[6]						[6]					
Vagina	[6]						[6]					
Pituitary	[6]						[6]					
Adrenal	[6]						[6]					
Thyroid	[6]						[6]					
Parathyroid	[6]						[6]					
Cerebrum	[6]						[6]					
Cerebellum	[6]						[6]					
Medulla oblongata	[6]						[6]					
Spinal code	[6]						[6]					
Sciatic nerve	[6]						[6]					
Eyeball	[6]						[6]					
Dysplasia, retina, right	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0
Harderian gland	[6]						[6]					
Bone marrow (sternum or femur)	[6]						[6]					
Bone (sternum or femur)	[6]						[6]					
Mammary gland	[6]						[6]					

a): No abnormality detected.

b): Abnormality detected.

c): Number in brackets is number of females examined.

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Table 47 Reproductive functions of male rats and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control	bumetizole		
mg/kg	0	62.5	250	1000
Number of females	12	12	12	12
Number of estrous cases before pairing (14 days) Mean±S.D.	3.1 ± 0.8	3.5 ± 0.5	3.4 ± 0.5	3.3 ± 0.5
Number of pairs	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	12	12	12	12
Copulation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of conceiving days Mean±S.D.	2.9 ± 1.2	1.9 ± 1.0	2.8 ± 1.2	3.1 ± 3.3
Conceiving days 1-5	12	12	12	11
Conceiving days ≥6	0	0	0	1
Number of pregnant females	11	12	12	11
Fertility index (%) ^{b)}	91.7	100.0	100.0	91.7

a): (Number of pairs with successful copulation / number of pairs)×100.

b): (Number of pregnant females / number of pairs with successful copulation)×100.

Table 48 Observation of pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole			
	0	62.5	250	1000	11	
Number of dams	11	12	12	11		
Length of gestation (days)	22.3 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.3 ± 0.5		
Pregnancy days ≤ 21	0	0	0	0		
Pregnancy days = 22	8	6	8	8		
Pregnancy days ≥ 23	3	6	4	3		
Corpora lutea	16.4 ± 1.6	15.6 ± 2.2	17.3 ± 1.7	16.5 ± 1.4		
Implantation scars	14.4 ± 1.3	15.0 ± 2.0	15.7 ± 2.1	15.4 ± 1.4		
Implantation index (%) ^{a)}	88.0 ± 4.6	96.3 ± 5.0 *	90.3 ± 6.2	93.7 ± 9.3		
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0		
Pups born	13.8 ± 1.2	13.8 ± 1.9	14.0 ± 2.6	14.7 ± 1.6		
Stillbirths	0.2 ± 0.6	0.4 ± 0.5	0.6 ± 0.7	0.4 ± 0.5		
Live pups born	13.6 ± 0.9	13.4 ± 1.9	13.4 ± 2.6	14.4 ± 1.6		
Sex ratio at birth ^{c)}	1.06 ± 0.29	1.34 ± 1.04	2.24 ± 3.14	1.21 ± 0.70		
(Total male/total female)	76/74	84/77	90/71	82/76		
Delivery index (%) ^{d)}	95.2 ± 5.1	89.7 ± 7.5	85.5 ± 11.5 *	93.5 ± 7.0		
Birth index (%) ^{e)}	95.3 ± 5.0	89.7 ± 7.5	85.5 ± 11.7 *	93.5 ± 7.0		
Live birth index (%) ^{f)}	98.9 ± 3.6	97.0 ± 3.8	95.8 ± 4.6	97.5 ± 3.4		
Live pups on Day 4 of lactation	13.5 ± 1.2	13.1 ± 1.9	13.3 ± 2.5	14.2 ± 1.7		
Sex ratio on Day 4 of lactation ^{c)}	1.06 ± 0.29	1.43 ± 1.08	2.25 ± 3.13	1.21 ± 0.71		
(Total male/total female)	75/73	84/73	90/69	81/75		
Viability index (%) ^{g)}	98.6 ± 4.6	97.5 ± 3.7	98.9 ± 3.8	98.7 ± 2.8		
External abnormalities (%) ^{h)}	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 2.1		
Acaudate	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 2.1		

Each value shows mean ± S.D. per dam.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

a): (Number of implantation scars/number of corpora lutea)×100.

c): Number of male pups/number of female pups.

e): (Number of live pups born/number of implantation scars)×100.

g): (Number of live pups on Day 4/number of live pups born)×100.

b): (Number of dams with live pups/number of pregnant dams)×100.

d): (Number of pups born/number of implantation scars)×100.

f): (Number of live pups born/number of pups born)×100.

h): (Number of pups with external abnormalities/number of live pups)×100.

Table 49 Delivery conditions and nursing conditions of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and delivery conditions/nursing conditions	Delivery conditions	Nursing conditions				
				Days of lactation				
				0	1	2	3	4
Control	0	Number of dams Normal	11	11	11	11	11	11
			11	11	11	11	11	11
bumetizole	62.5	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12
	250	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12
	1000	Number of dams Normal	11	11	11	11	11	11
			11	11	11	11	11	11

Table 50 General signs of pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	mg/kg	Number of pups and general signs	Days of lactation				
			0	1	2	3	4
Control	0	Number of pups	152	150	150	149	149
		Normal	150	150	149	149	148
		Death	2	0	1	0	1
bumetizole	62.5	Number of pups	166	161	160	159	159
		Normal	161	160	159	159	157
		Death	5	1	1	0	2
	250	Number of pups	168	161	159	159	159
		Normal	161	159	159	159	159
		Death	7	2	0	0	0
	1000	Number of pups	162	158	157	157	156
		Normal	158	157	157	156	156
		Death	4	1	0	1	0

Table 51 Body weights of pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole		
	0	62.5	250	1000	
Number of dams	11	12	12	11	
Male weight					
Days of lactation					
0	6.9 ± 0.5	7.2 ± 0.7	7.0 ± 0.6	6.8 ± 0.4	
4	10.9 ± 0.8	11.2 ± 0.8	11.4 ± 1.4	10.8 ± 0.7	
Female weight					
Days of lactation					
0	6.4 ± 0.6	6.8 ± 0.6	6.6 ± 0.7	6.4 ± 0.7	
4	10.4 ± 0.8	10.6 ± 0.9	10.8 ± 1.5	10.3 ± 0.9	
Mean pups weight					
Days of lactation					
0	6.7 ± 0.5	7.0 ± 0.7	6.9 ± 0.6	6.6 ± 0.6	
4	10.6 ± 0.8	10.9 ± 0.9	11.1 ± 1.4	10.6 ± 0.7	
Litter weight					
Days of lactation					
0	90.5 ± 9.3	93.8 ± 16.4	91.3 ± 14.0	94.8 ± 10.9	
4	143.8 ± 15.1	142.0 ± 19.4	145.5 ± 20.6	149.6 ± 13.3	

Each value shows mean (g) ± S.D. per dam.

Table 52 Necropsy findings of dead pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group mg/kg	Control		bumetizole	
	0	62.5	250	1000
Number of dams	1	4	5	4
Number of dead pups	1	4	6	4
Normal	1	4	5	4
Abnormal	0	0	1	0
Lack of abdominal organs	0	0	1	0

Table 53 Necropsy findings of pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

Group	Control	bumetizole		
		62.5	250	1000
mg/kg	0	62.5	250	1000
Number of dams	11	12	12	11
Number of male pups	75	84	90	81
Normal	75	84	90	81
Abnormal	0	0	0	0
Number of dams	11	12	12	11
Number of female pups	73	73	69	75
Normal	73	73	69	75
Abnormal	0	0	0	0

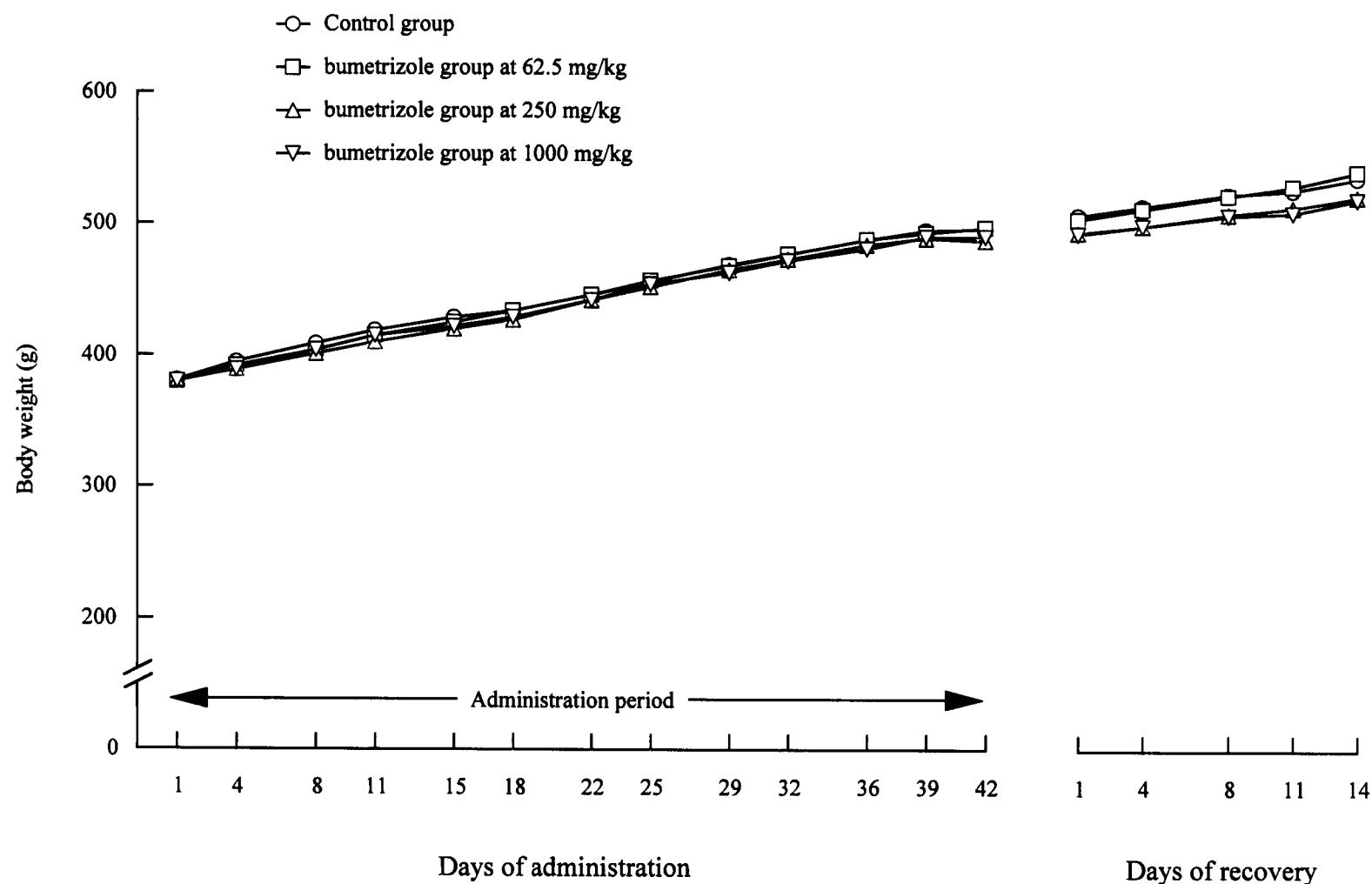


Fig. 2 Body weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

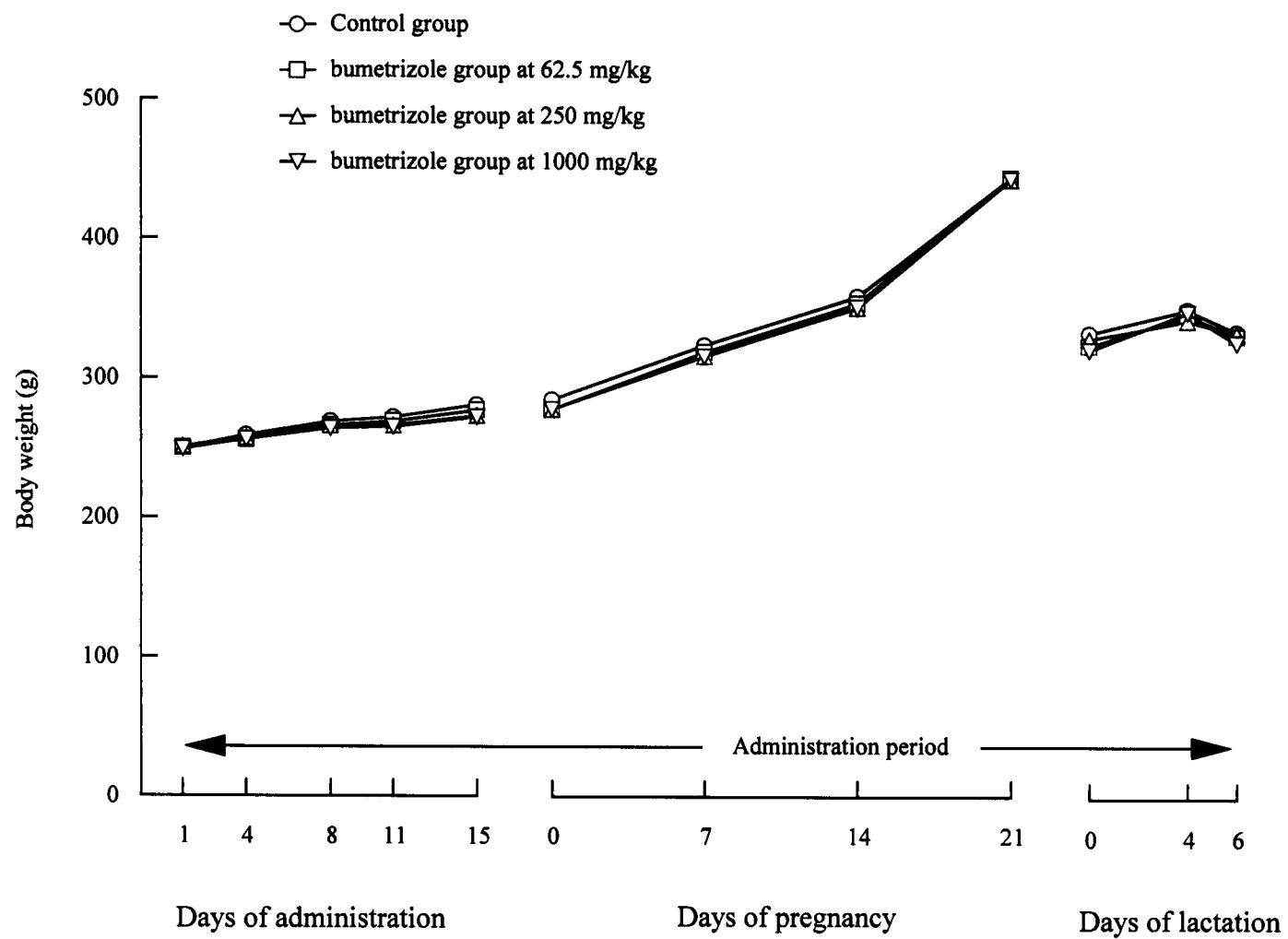


Fig. 3 Body weights of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

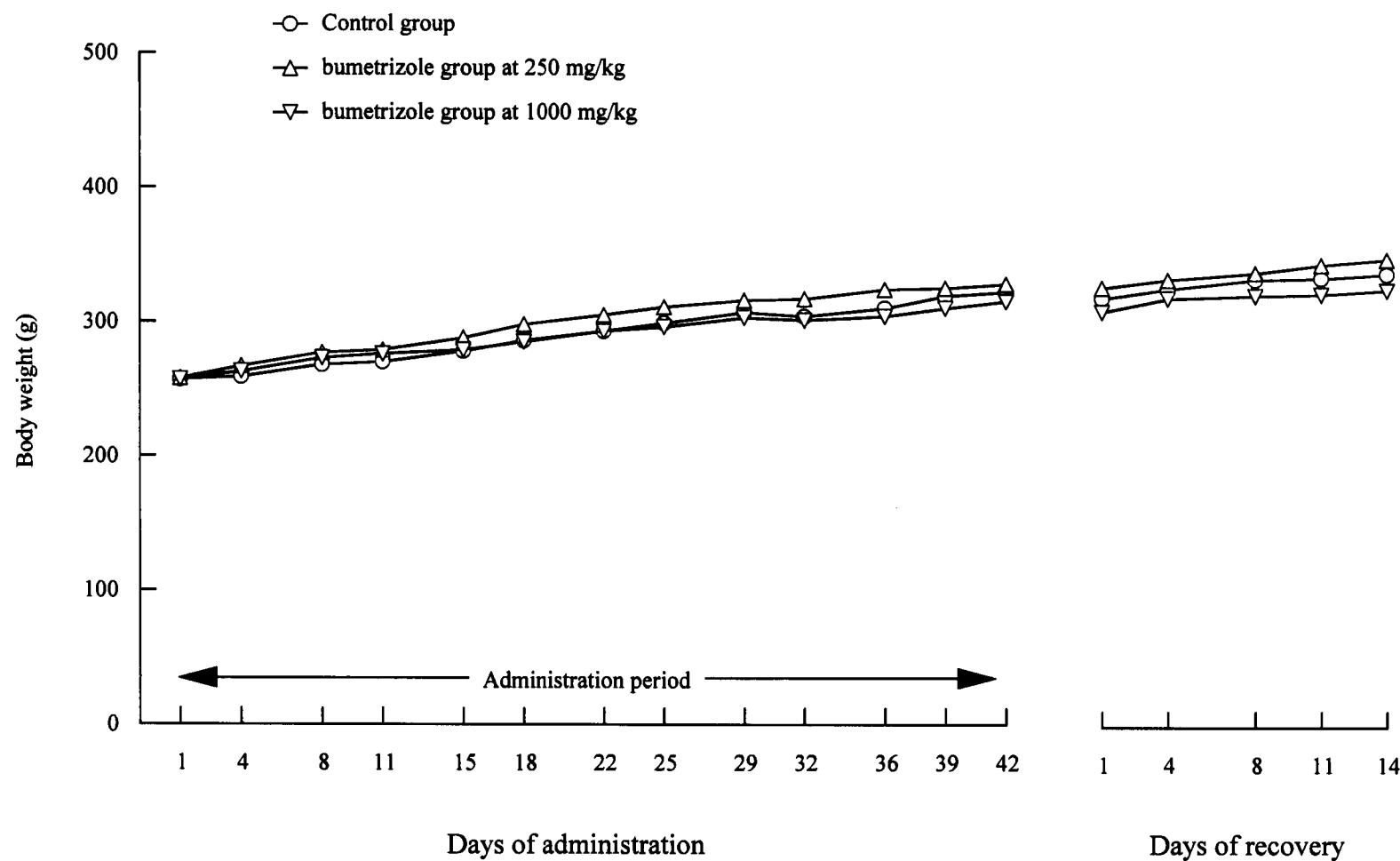


Fig. 4 Body weights of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

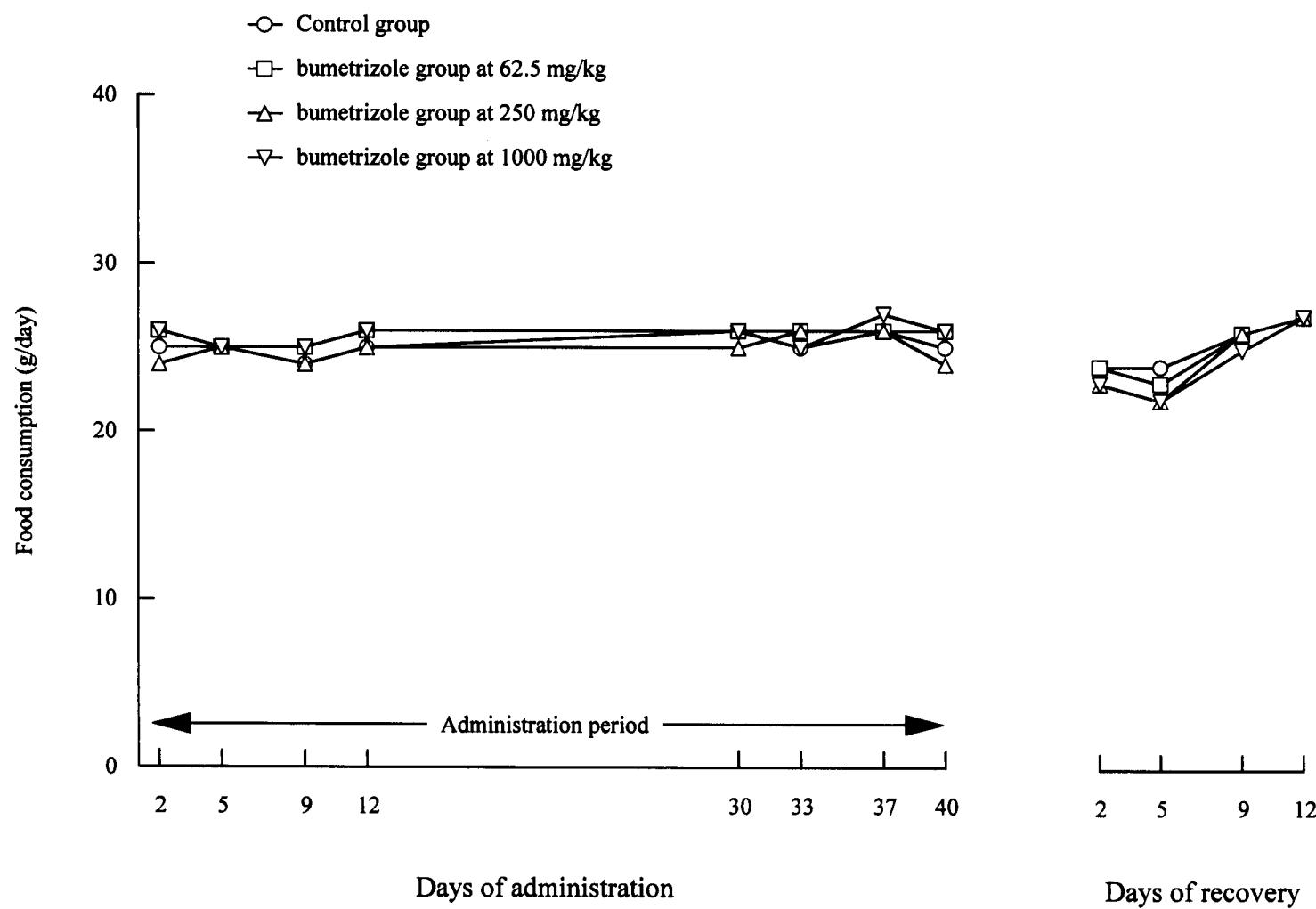


Fig. 5 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

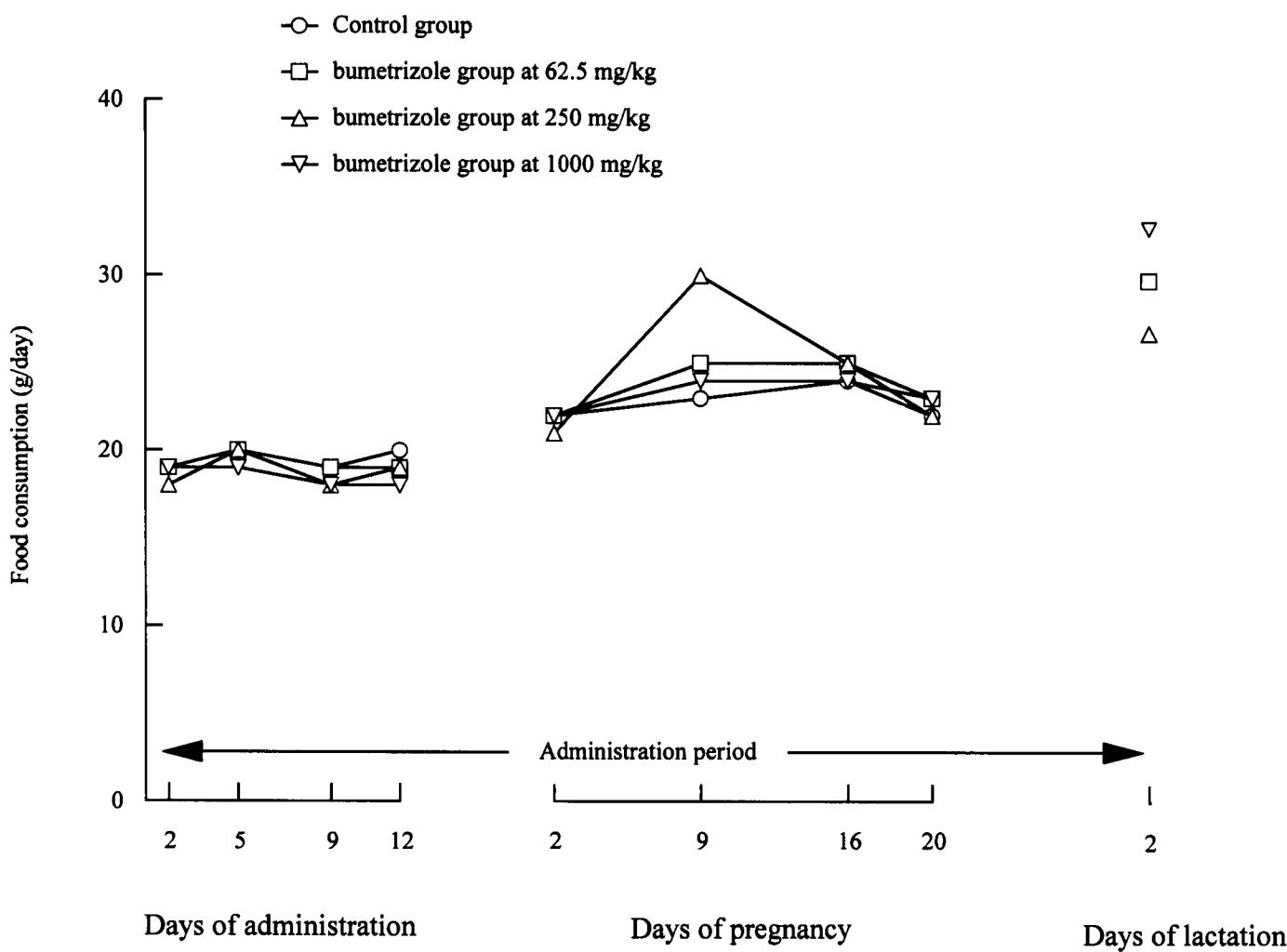


Fig. 6 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

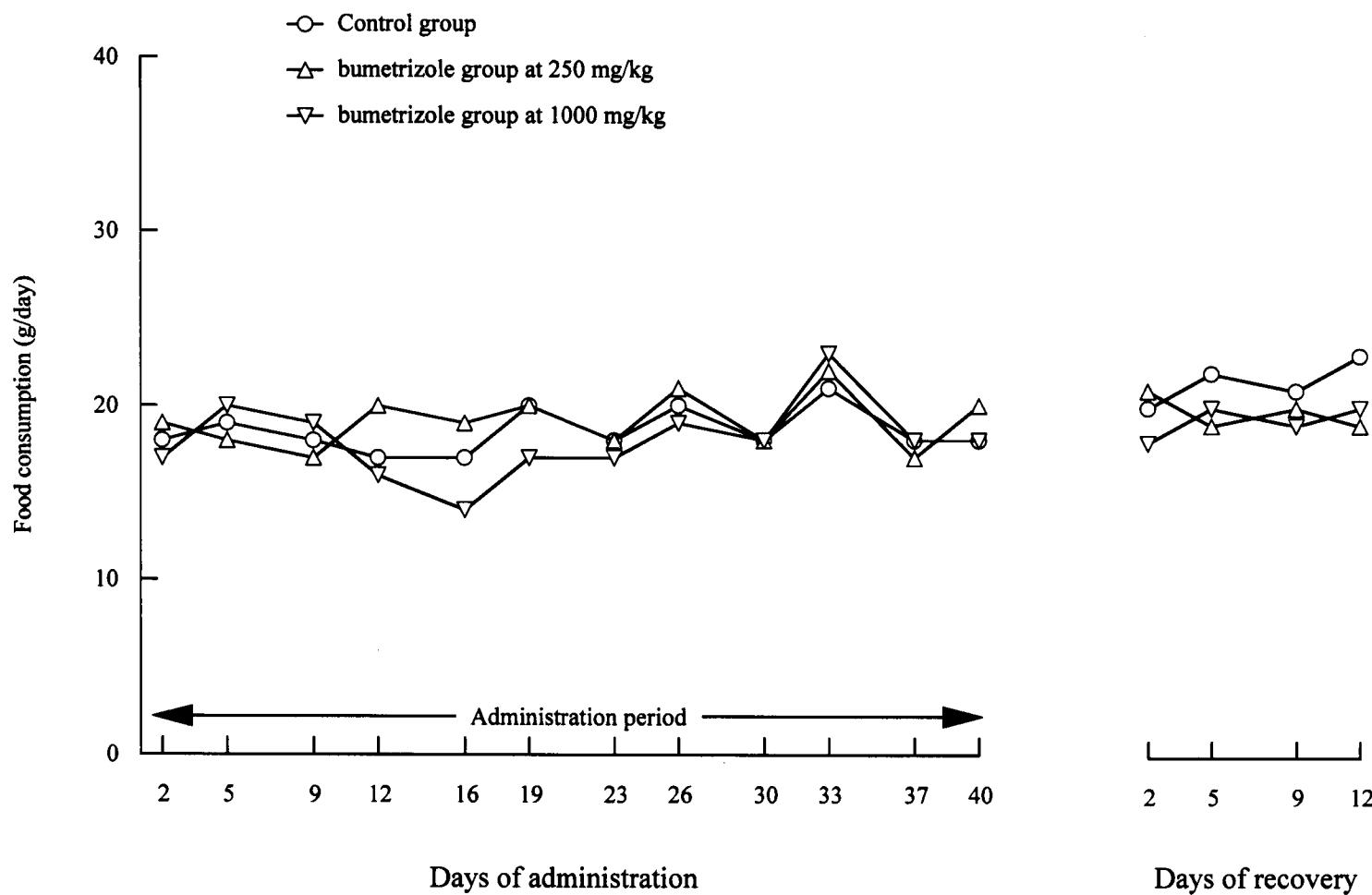
559
- 130 -

Fig. 7 Food consumption of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of bumetizole by oral administration

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	ブメトリゾール		
別 名	2-(2'-ヒドロキシ-3-tert-ブチル-5'-メチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール		
C A S 番 号	3896-11-5		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分 子 量	315.80		
試験に供した新規 化 学 物 質 の 純 度	99.9%		
試験に供した新規 化 学 物 質 の Lot No.	01721IW4		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	7.5×10^{-7} Pa (20°C)		
対 水 溶 解 度	<1mg/L (20°C) EEC A6		
1-オクタノール/水分配係数	LogPow > 6 (20 – 25°C)		
融 点	138 – 141°C		
沸 点	—		
常温における性状	淡黄色粉末、臭いなし		
安 定 性	常温・常圧で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	DMSO	5 mg/mL以下*	**
その他			

*: 試験施設において確認

**: 50 mg/mL DMSO懸濁液に発熱、発泡は認められず。

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入 手 年 月 日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1996年 10月 18日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1996年 10月 18日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1995年 2月 25日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1537	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1995年 2月 25日
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1995年 2月 25日

3. S9 mix

(1) S9の入手法等(該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	1.自 製 ②購 入 (製造元:オリエンタル酵母工業株式会社)
製 造 年 月 日	2005年 1月 21日製造
購入の場合のLot No.	05012111
保 存 溫 度	-80 °C

(2) S9の調製方法

使 用 動 物		誘 導 物 質		
種 系 統	ラット, Crj:CD (SD)	名 称	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)	
性	雄	投 与 方 法	i.p.	
週 令	7 週	投与期間及び投与量 (g / k g 体 重)	1日目 PB 0.03 g/kg 2,3,4日目 PB 0.06 g/kg 3日目 BF 0.08 g/kg	
体 重	216.4 ± 8.9 g			

(3) S9 mixの組成

成 分	S9 mix 1mL中の量	成 分	S9 mix 1mL中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 μmoL
MgCl ₂	8 μmoL	NADH	4 μmoL
KCl	33 μmoL	Na-リン酸緩衝液	100 μmoL
グルコース-6-リン酸	5 μmoL	その他(注射用水)	0.9 mL

4. 被験物質溶液の調製（被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。）

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	ジメチルスルホキシド	株式会社同仁化学研究所	PU140	紫外外部吸収 スペクタル用	100.0
溶媒選択の理由	ジメチルスルホキシド(DMSO)は、細菌を用いる復帰突然変異試験で一般的に用いられており、良好な懸濁状態となるため。				
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	タッヂミキサーで攪拌することにより均一な懸濁状態とした。				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	一 時間	一分	-°C	用量設定試験、本試験(I)、本試験(II)とも用時調製	
純度換算の有無	有	(換算計数：)		無	

5. 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名称	製造元	Lot No.
	OXOID NUTRIENT BROTH No.2	OXOID Ltd.	298714
前 培 養 時 間	9 時間		
培養容器(形状・容量)	形状：L字管 容量：約 40 mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	20 μL

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌 株 名	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
生菌数 (×10 ⁹ /mL)	用量設定試験	3.1	4.4	5.1	3.6
	本 試 験 (I)	3.2	4.5	5.2	3.7
	本 試 験 (II)	3.1	4.3	5.1	3.6
測定方法 (いずれかを○で囲むこと。)	① O. D. 値よりの換算 3. その他 ()			2. 段階希釈	

6. 最少グルコース寒天平板培地（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

自 製 ・ 購 入 の 別	1.自 製 ②購 入 (製造元:オリエンタル酵母工業株式会社)
製 造 年 月 日	2005年 2月 5日製造
購 入 の 場 合 の L o t N o .	ANI090BU
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	伊那寒天 BA-30A 伊那食品工業(株) Lot No.40721

7. 試験の方法（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

(1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	① プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他 ()
その他の場合は その選定理由	—

(2) 試験条件

組 成	菌 懸 濁 液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液（直接法による場合）	0.5 mL
	S9 mix（代謝活性化法による場合）	0.5 mL
	ト ッ プ ア ガー	2 mL
	そ の 他 ()	—
プレインキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	約48 時間

8. コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル計測 ②機器計測
補正の有無	1. 無 ②有(補正の方法 面積補正+数え落とし補正)

9. 試験結果

(1) 試験の結果は別表1-1～1-5による。

(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)	陽性	陰性
判定の理由		
<p>本被験物質は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても、復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以上に増加しなかった。</p> <p>2回実施した本試験には再現性が認められた。</p> <p>本試験で用いた陽性対照物質は明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は背景データの範囲内にあり、試験条件を満たすものであったことから、試験系に影響した他の要因がなく、試験は適切に実施されたことが確認された。</p> <p>以上の結果より、本被験物質は陰性と判定した。</p>		

(陽性と判定した場合には、別表2 比活性の表を添付すること。)

(3) 参考事項

[用量設定理由]

本試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために用量設定試験を実施した。用量設定試験の試験濃度は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日)に従い、いずれの菌株も5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高濃度として、以下公比4で1250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22及び0.305 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の計8濃度を設定した。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

用量設定試験の結果から本試験(I)及び本試験(II)の濃度は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が4濃度以上含まれるように、以下公比2で6濃度を設定した。すなわち、S9 mix無添加の場合、TA100では9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA1535及びWP2uvrAでは39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625及び1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA98及びTA1537では0.61, 1.22, 2.44, 4.88, 9.77及び19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。S9 mix添加の場合、TA100, TA1535, TA98及びTA1537では9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP2uvrAでは39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625及び1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

[被験物質の析出]

プレート上の析出物は、S9 mix無添加の場合、培養開始時には39.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上(用量設定試験では78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上)の濃度において、培養終了時には19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の油膜状析出物及び白色の微細な析出物が認められた。S9 mix添加の場合、培養開始時には156.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上(用量設定試験では312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上)の濃度において、培養終了時には78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の微細な析出物が認められた。

(別表1-1)

試験結果表

被験物質の名称: ブメトリゾール(用量設定試験)

試験実施期間		2005年 5月 10日 より 2005年 5月 13日				
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/\text{P}\text{レート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
-S9 mix	陰性対照	153 (153)	10 (10)	43 (43)	10 (10)	10 (10)
	0.305	121 (121)	5 (5)	54 (54)	14 (14)	12 (12)
	1.22	126 (126)	5 (5)	41 (41)	19 (19)	9 (9)
	4.88	130 (130)	12 (12)	38 (38)	14 (14)	12 (12)
	19.5#	137 (137)	8 (8)	37 (37)	17* (17)	6* (6)
	78.1#	118 (118)	10 (10)	51 (51)	19* (19)	11* (11)
	312.5#	147* (147)	13 (13)	47 (47)	13* (13)	8* (8)
	1250#	116* (116)	8* (8)	39* (39)	12* (12)	9* (9)
	5000#	144* (144)	9* (9)	43* (43)	12* (12)	7* (7)
+S9 mix	陰性対照	142 (142)	11 (11)	45 (45)	19 (19)	13 (13)
	0.305	137 (137)	9 (9)	37 (37)	23 (23)	20 (20)
	1.22	130 (130)	7 (7)	29 (29)	20 (20)	14 (14)
	4.88	131 (131)	7 (7)	39 (39)	18 (18)	14 (14)
	19.5	114 (114)	9 (9)	50 (50)	13 (13)	17 (17)
	78.1#	123 (123)	5 (5)	45 (45)	19 (19)	14 (14)
	312.5#	136* (136)	9* (9)	35 (35)	21* (21)	17* (17)
	1250#	113* (113)	5* (5)	46* (46)	24* (24)	12* (12)
	5000#	139* (139)	6* (6)	39* (39)	20* (20)	12* (12)
陽性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{P}\text{レート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数/ $\text{P}\text{レート}$	556 (556)	573 (573)	159 (159)	517 (517)
	S9 mixを 必要とす るもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{P}\text{レート}$)	1	2	10	0.5
		コロニー数/ $\text{P}\text{レート}$	903 (903)	363 (363)	990 (990)	400 (400)

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: sodium azide; 9AA: 9-aminoacridine hydrochloride;
2AA: 2-aminoanthracene.

(別表 1-2)

試験結果表

被験物質の名称：ブメトリゾール（本試験Ⅰ）

試験実施期間		2005年 5月 23日 より					2005年 5月 26日				
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{レート}$)	復帰変異数（コロニー数／プレート）									
		塩基対置換型					フレームシフト型				
		TA100	TA1535	WP2uvrA			TA98	TA1537			
-S9 mix	陰性対照	86 107 123 (105±18.6)	11 13 15 (13±2.0)	17 27 28 (24±6.1)			13 15 15 (14±1.2)	7 9 16 (11±4.7)			
	0.61						17 17 19 (18±1.2)	2 7 9 (6±3.6)			
	1.22						13 22 25 (20±6.2)	9 10 11 (10±1.0)			
	2.44						19 19 26 (21±4.0)	10 10 11 (10±0.6)			
	4.88						18 20 28 (22±5.3)	8 11 13 (11±2.5)			
	9.77	90 96 112 (99±11.4)					19* 22* 23* (21±2.1)	7* 11* 13* (10±3.1)			
	19.5#	90 115 115 (107±14.4)					17* 22* 23* (21±3.2)	7* 7* 15* (10±4.6)			
	39.1#	91 96 97 (95±3.2)	9 9 12 (10±1.7)	19 27 37 (28±9.0)							
	78.1#	98 103 108 (103±5.0)	13 13 13 (13±0.0)	23 27 30 (27±3.5)							
	156.3#	97* 98* 116* (104±10.7)	10 17 20 (16±5.1)	25 34 34 (31±5.2)							
	312.5#	80* 95* 96* (90±9.0)	10 10 22 (14±6.9)	24 30 37 (30±6.5)							
	625#		13* 16* 17* (15±2.1)	26 29 37 (31±5.7)							
	1250#		6* 7* 13* (9±3.8)	20* 28* 32* (27±6.1)							
陽性 対照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	AF-2	9AA			
		用 量 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{レート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	0.1	80			
		コロニー数/ 7°レート	414 459 474 (449±31.2)	573 635 646 (618±39.4)	103 132 137 (124±18.4)	365 374 375 (371±5.5)	391 413 427 (410±18.1)				
対照	S9 mixを 必要とす るもの	名 称									
		用 量 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{レート}$)									
		コロニー数/ 7°レート									

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: sodium azide; 9AA: 9-aminoacridine hydrochloride.

(別表1-3)

試験結果表

被験物質の名称：ブメトリゾール（本試験I）

試験実施期間		2005年 5月 23日 より					2005年 5月 26日				
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/\text{P}^{\circ}\text{レート}$)	復帰変異数（コロニー数／プレート）									
		塩基対置換型					フレームシフト型				
		TA100	TA1535	WP2uvrA			TA98	TA1537			
+S9 mix	陰性対照	99 121 129 (116±15.5)	11 12 15 (13±2.1)	33 34 34 (34±0.6)			26 28 34 (29±4.2)	17 18 20 (18±1.5)			
	9.77	107 108 121 (112±7.8)	9 14 26 (16±8.7)				23 28 32 (28±4.5)	22 22 24 (23±1.2)			
	19.5	108 116 130 (118±11.1)	5 12 17 (11±6.0)				20 24 32 (25±6.1)	16 17 20 (18±2.1)			
	39.1	94 95 123 (104±16.5)	7 11 11 (10±2.3)	29 35 35 (33±3.5)			22 27 29 (26±3.6)	12 14 20 (15±4.2)			
	78.1#	77 96 104 (92±13.9)	13 14 18 (15±2.6)	20 29 30 (26±5.5)			24 28 29 (27±2.6)	12 13 16 (14±2.1)			
	156.3#	91 114 120 (108±15.3)	12 16 17 (15±2.6)	27 29 30 (29±1.5)			20 22 29 (24±4.7)	13 20 21 (18±4.4)			
	312.5#	82* 110* 112* (101±16.8)	12* 15* 23* (17±5.7)	27 29 31 (29±2.0)			23* 26* 26* (25±1.7)	17* 17* 21* (18±2.3)			
	625#				17 29 30 (25±7.2)						
	1250#				20* 26* 35* (27±7.5)						
陽性 対照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称									
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{P}^{\circ}\text{レート}$)									
		コロニー数/ $\text{P}^{\circ}\text{レート}$									
S9 mixを 必要とす るもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	用 量 ($\mu\text{g}/\text{P}^{\circ}\text{レート}$)	1	2	10	0.5	2					
	コロニー数/ $\text{P}^{\circ}\text{レート}$	861 881 920 (887±30.0)	315 332 346 (331±15.5)	737 765 778 (760±21.0)	389 415 436 (413±23.5)	128 139 140 (136±6.7)					

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

2AA: 2-Aminoanthracene.

(別表1-4)

試験結果表

被験物質の名称: ブメトリゾール(本試験Ⅱ)

試験実施期間		2005年 5月 30日 より					2005年 6月 2日		
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/\text{フレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)							
		塩基対置換型			フレームシフト型				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537			
-S9 mix	陰性対照	99 101 111 (104±6.4)	5 6 7 (6±1.0)	28 30 34 (31±3.1)	17 18 22 (19±2.6)	5 7 9 (7±2.0)			
	0.61				21 22 26 (23±2.6)	6 10 10 (9±2.3)			
	1.22				13 21 27 (20±7.0)	10 10 12 (11±1.2)			
	2.44				19 19 23 (20±2.3)	7 8 11 (9±2.1)			
	4.88				13 25 25 (21±6.9)	7 8 10 (8±1.5)			
	9.77	110 112 121 (114±5.9)			17* 24* 27* (23±5.1)	6* 7* 7* (7±0.6)			
	19.5#	98 110 117 (108±9.6)			14* 18* 29* (20±7.8)	4* 6* 10* (7±3.1)			
	39.1#	102 105 118 (108±8.5)	5 6 12 (8±3.8)	20 24 27 (24±3.5)					
	78.1#	95 96 104 (98±4.9)	9 10 11 (10±1.0)	21 21 30 (24±5.2)					
	156.3#	109* 116* 125* (117±8.0)	4 12 14 (10±5.3)	24 28 29 (27±2.6)					
	312.5#	89* 104* 108* (100±10.0)	5 10 11 (9±3.2)	18 18 29 (22±6.4)					
	625#		7* 12* 13* (11±3.2)	17 20 36 (24±10.2)					
	1250#		10* 10* 11* (10±0.6)	19* 25* 26* (23±3.8)					
陽性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA		
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{フレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80		
		コロニー数/フレート	451 457 581 (496±73.4)	515 536 601 (551±44.8)	123 127 131 (127±4.0)	454 464 472 (463±9.0)	294 411 597 (434±152.8)		
陽性 対 照	S9 mixを 必要とす るもの	名 称							
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{フレート}$)							
		コロニー数/フレート							

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: sodium azide; 9AA: 9-aminoacridine hydrochloride.

(別表 1 - 5)

試験結果表

被験物質の名称：ブメトリゾール（本試験Ⅱ）

試験実施期間		2005年 5月 30日 より			2005年 6月 2日		
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/\text{P}^{\circ}\text{レート}$)	復帰変異数（コロニー数／プレート）					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
+S9 mix	陰性対照	117 118 128 (121±6.1)	7 11 13 (10±3.1)	24 26 31 (27±3.6)	20 30 33 (28±6.8)	14 14 22 (17±4.6)	
	9.77	104 106 109 (106±2.5)	7 10 12 (10±2.5)		19 22 24 (22±2.5)	11 13 15 (13±2.0)	
	19.5	101 106 132 (113±16.6)	5 7 11 (8±3.1)		21 21 25 (22±2.3)	12 16 20 (16±4.0)	
	39.1	104 111 121 (112±8.5)	10 10 11 (10±0.6)	21 23 34 (26±7.0)	21 26 34 (27±6.6)	11 19 20 (17±4.9)	
	78.1#	104 113 120 (112±8.0)	3 6 8 (6±2.5)	26 33 38 (32±6.0)	25 27 32 (28±3.6)	16 18 25 (20±4.7)	
	156.3#	114 115 118 (116±2.1)	6 8 9 (8±1.5)	22 30 30 (27±4.6)	20 26 28 (25±4.2)	3 17 18 (13±8.4)	
	312.5#	97* 112* 112* (107±8.7)	6* 6* 7* (6±0.6)	21 31 35 (29±7.2)	20* 22* 37* (26±9.3)	7* 13* 13* (11±3.5)	
	625#			28 29 34 (30±3.2)			
	1250#			31* 33* 38* (34±3.6)			
陽性 対照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称					
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{P}^{\circ}\text{レート}$)					
		コロニー数/ $\text{P}^{\circ}\text{レート}$					
	S9 mixを 必要とす るもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{P}^{\circ}\text{レート}$)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/ $\text{P}^{\circ}\text{レート}$	898 944 958 (933±31.4)	347 350 419 (372±40.7)	769 790 795 (785±13.8)	431 450 475 (452±22.1)	115 141 141 (132±15.0)

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

2AA: 2-Aminoanthracene.

被験物質名：ブメトリゾール (CAS No. 3896-11-5)

試験系：*Salmonella typhimurium* : TA100, TA98, TA1535, TA1537

Escherichia coli : WP2uvrA

試験委託者：厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的：ブメトリゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験を行い、その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した。

準拠したガイドライン：

「OECD化学品テストガイドライン、471細菌を用いる復帰突然変異試験」(1997年7月21日採択)並びに平成15年11月21日付(薬食発第1121002号：厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・13製局第2号：経済産業省製造産業局長、環保企発第031121002号：環境省総合環境政策局長連名通知)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守したGLP：新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

試験開始日：2005年 4月 1日

試験終了日：2006年 11月 13日

試験実施日：用量設定試験

菌株の前培養実施日（実験開始日）	2005年 5月 10日
------------------	--------------

試験の実施日	2005年 5月 11日
--------	--------------

判定日	2005年 5月 13日
-----	--------------

本試験(I)

菌株の前培養実施日	2005年 5月 23日
-----------	--------------

試験の実施日	2005年 5月 24日
--------	--------------

判定日	2005年 5月 26日
-----	--------------

要 約

ブメトリゾールの遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium*のTA100, TA98, TA1535及びTA1537並びに*Escherichia coli*のWP2uvrAを用い、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験により検討した。試験は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合について実施した。

ブメトリゾールの0.61～1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 濃度における復帰変異コロニー数は、本試験(I)及び本試験(II)において、いずれの菌株ともS9 mix無添加及びS9 mix添加の場合にかかわらず、陰性対照の2倍未満であった。陽性対照物質は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれにおいても、明らかな陽性結果を示した。本試験(I)及び本試験(II)の結果には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、ブメトリゾールに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

Table 1. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria(dose-finding test)

With(+) or without(-) S9 mix	Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	153	10	43	10	10
	0.305	121	5	54	14	12
	1.22	126	5	41	19	9
	4.88	130	12	38	14	12
	19.5#	137	8	37	17*	6*
	78.1#	118	10	51	19*	11*
	312.5#	147*	13	47	13*	8*
	1250#	116*	8*	39*	12*	9*
	5000#	144*	9*	43*	12*	7*
S9 mix (+)	Negative control	142	11	45	19	13
	0.305	137	9	37	23	20
	1.22	130	7	29	20	14
	4.88	131	7	39	18	14
	19.5	114	9	50	13	17
	78.1##	123	5	45	19	14
	312.5##	136*	9*	35	21*	17*
	1250##	113*	5*	46*	24*	12*
	5000##	139*	6*	39*	20*	12*
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	556	573	159	517	516
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA				
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	903	363	990	400	155

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide; NaN₃ : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride;

2AA : 2-aminoanthracene.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-1. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test I : -S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Negative control	86 , 107 , 123 (105±18.6)	11 , 13 , 15 (13±2.0)	17 , 27 , 28 (24±6.1)	13 , 15 , 15 (14±1.2)	7 , 9 , 16 (11±4.7)
0.61				17 , 17 , 19 (18±1.2)	2 , 7 , 9 (6±3.6)
1.22				13 , 22 , 25 (20±6.2)	9 , 10 , 11 (10±1.0)
2.44				19 , 19 , 26 (21±4.0)	10 , 10 , 11 (10±0.6)
4.88				18 , 20 , 28 (22±5.3)	8 , 11 , 13 (11±2.5)
9.77	90 , 96 , 112 (99±11.4)			19*, 22*, 23* (21±2.1)	7*, 11*, 13* (10±3.1)
19.5#	90 , 115 , 115 (107±14.4)			17*, 22*, 23* (21±3.2)	7*, 7*, 15* (10±4.6)
39.1#	91 , 96 , 97 (95±3.2)	9 , 9 , 12 (10±1.7)	19 , 27 , 37 (28±9.0)		
78.1#	98 , 103 , 108 (103±5.0)	13 , 13 , 13 (13±0.0)	23 , 27 , 30 (27±3.5)		
156.3#	97*, 98*, 116* (104±10.7)	10 , 17 , 20 (16±5.1)	25 , 34 , 34 (31±5.2)		
312.5#	80*, 95*, 96* (90±9.0)	10 , 10 , 22 (14±6.9)	24 , 30 , 37 (30±6.5)		
625#		13*, 16*, 17* (15±2.1)	26 , 29 , 37 (31±5.7)		
1250#		6*, 7*, 13* (9±3.8)	20*, 28*, 32* (27±6.1)		
Positive control					
Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
Number of colonies/plate	414 , 459 , 474 (449±31.2)	573 , 635 , 646 (618±39.4)	103 , 132 , 137 (124±18.4)	365 , 374 , 375 (371±5.5)	391 , 413 , 427 (410±18.1)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3 : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride.

() : Mean±S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-2. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test I : +S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Negative control	99 , 121 , 129 (116±15.5)	11 , 12 , 15 (13±2.1)	33 , 34 , 34 (34±0.6)	26 , 28 , 34 (29±4.2)	17 , 18 , 20 (18±1.5)
9.77	107 , 108 , 121 (112±7.8)	9 , 14 , 26 (16±8.7)		23 , 28 , 32 (28±4.5)	22 , 22 , 24 (23±1.2)
19.5	108 , 116 , 130 (118±11.1)	5 , 12 , 17 (11±6.0)		20 , 24 , 32 (25±6.1)	16 , 17 , 20 (18±2.1)
39.1	94 , 95 , 123 (104±16.5)	7 , 11 , 11 (10±2.3)	29 , 35 , 35 (33±3.5)	22 , 27 , 29 (26±3.6)	12 , 14 , 20 (15±4.2)
78.1##	77 , 96 , 104 (92±13.9)	13 , 14 , 18 (15±2.6)	20 , 29 , 30 (26±5.5)	24 , 28 , 29 (27±2.6)	12 , 13 , 16 (14±2.1)
156.3##	91 , 114 , 120 (108±15.3)	12 , 16 , 17 (15±2.6)	27 , 29 , 30 (29±1.5)	20 , 22 , 29 (24±4.7)	13 , 20 , 21 (18±4.4)
312.5##	82*, 110*, 112* (101±16.8)	12*, 15*, 23* (17±5.7)	27 , 29 , 31 (29±2.0)	23*, 26*, 26* (25±1.7)	17*, 17*, 21* (18±2.3)
625##			17 , 29 , 30 (25±7.2)		
1250##			20*, 26*, 35* (27±7.5)		
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	861 , 881 , 920 (887±30.0)	315 , 332 , 346 (331±15.5)	737 , 765 , 778 (760±21.0)	389 , 415 , 436 (413±23.5)	128 , 139 , 140 (136±6.7)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

() : Mean±S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

#: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 3-1. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II : -S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Negative control	99 , 101 , 111 (104±6.4)	5 , 6 , 7 (6±1.0)	28 , 30 , 34 (31±3.1)	17 , 18 , 22 (19±2.6)	5 , 7 , 9 (7±2.0)
0.61				21 , 22 , 26 (23±2.6)	6 , 10 , 10 (9±2.3)
1.22				13 , 21 , 27 (20±7.0)	10 , 10 , 12 (11±1.2)
2.44				19 , 19 , 23 (20±2.3)	7 , 8 , 11 (9±2.1)
4.88				13 , 25 , 25 (21±6.9)	7 , 8 , 10 (8±1.5)
9.77	110 , 112 , 121 (114±5.9)			17*, 24*, 27* (23±5.1)	6*, 7*, 7* (7±0.6)
19.5#	98 , 110 , 117 (108±9.6)			14*, 18*, 29* (20±7.8)	4*, 6*, 10* (7±3.1)
39.1#	102 , 105 , 118 (108±8.5)	5 , 6 , 12 (8±3.8)	20 , 24 , 27 (24±3.5)		
78.1#	95 , 96 , 104 (98±4.9)	9 , 10 , 11 (10±1.0)	21 , 21 , 30 (24±5.2)		
156.3#	109*, 116*, 125* (117±8.0)	4 , 12 , 14 (10±5.3)	24 , 28 , 29 (27±2.6)		
312.5#	89*, 104*, 108* (100±10.0)	5 , 10 , 11 (9±3.2)	18 , 18 , 29 (22±6.4)		
625#		7*, 12*, 13* (11±3.2)	17 , 20 , 36 (24±10.2)		
1250#		10*, 10*, 11* (10±0.6)	19*, 25*, 26* (23±3.8)		
Positive control					
Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
Number of colonies/plate	451 , 457 , 581 (496±73.4)	515 , 536 , 601 (551±44.8)	123 , 127 , 131 (127±4.0)	454 , 464 , 472 (463±9.0)	294 , 411 , 597 (434±152.8)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3 : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride.

() : Mean±S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 3-2. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Negative control	117 , 118 , 128 (121±6.1)	7 , 11 , 13 (10±3.1)	24 , 26 , 31 (27±3.6)	20 , 30 , 33 (28±6.8)	14 , 14 , 22 (17±4.6)
9.77	104 , 106 , 109 (106±2.5)	7 , 10 , 12 (10±2.5)		19 , 22 , 24 (22±2.5)	11 , 13 , 15 (13±2.0)
19.5	101 , 106 , 132 (113±16.6)	5 , 7 , 11 (8±3.1)		21 , 21 , 25 (22±2.3)	12 , 16 , 20 (16±4.0)
39.1	104 , 111 , 121 (112±8.5)	10 , 10 , 11 (10±0.6)	21 , 23 , 34 (26±7.0)	21 , 26 , 34 (27±6.6)	11 , 19 , 20 (17±4.9)
78.1##	104 , 113 , 120 (112±8.0)	3 , 6 , 8 (6±2.5)	26 , 33 , 38 (32±6.0)	25 , 27 , 32 (28±3.6)	16 , 18 , 25 (20±4.7)
156.3##	114 , 115 , 118 (116±2.1)	6 , 8 , 9 (8±1.5)	22 , 30 , 30 (27±4.6)	20 , 26 , 28 (25±4.2)	3 , 17 , 18 (13±8.4)
312.5##	97*, 112*, 112* (107±8.7)	6*, 6*, 7* (6±0.6)	21 , 31 , 35 (29±7.2)	20*, 22*, 37* (26±9.3)	7*, 13*, 13* (11±3.5)
625##			28 , 29 , 34 (30±3.2)		
1250##			31*, 33*, 38* (34±3.6)		
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	898 , 944 , 958 (933±31.4)	347 , 350 , 419 (372±40.7)	769 , 790 , 795 (785±13.8)	431 , 450 , 475 (452±22.1)	115 , 141 , 141 (132±15.0)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

(): Mean±S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

#: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Study No. 901924

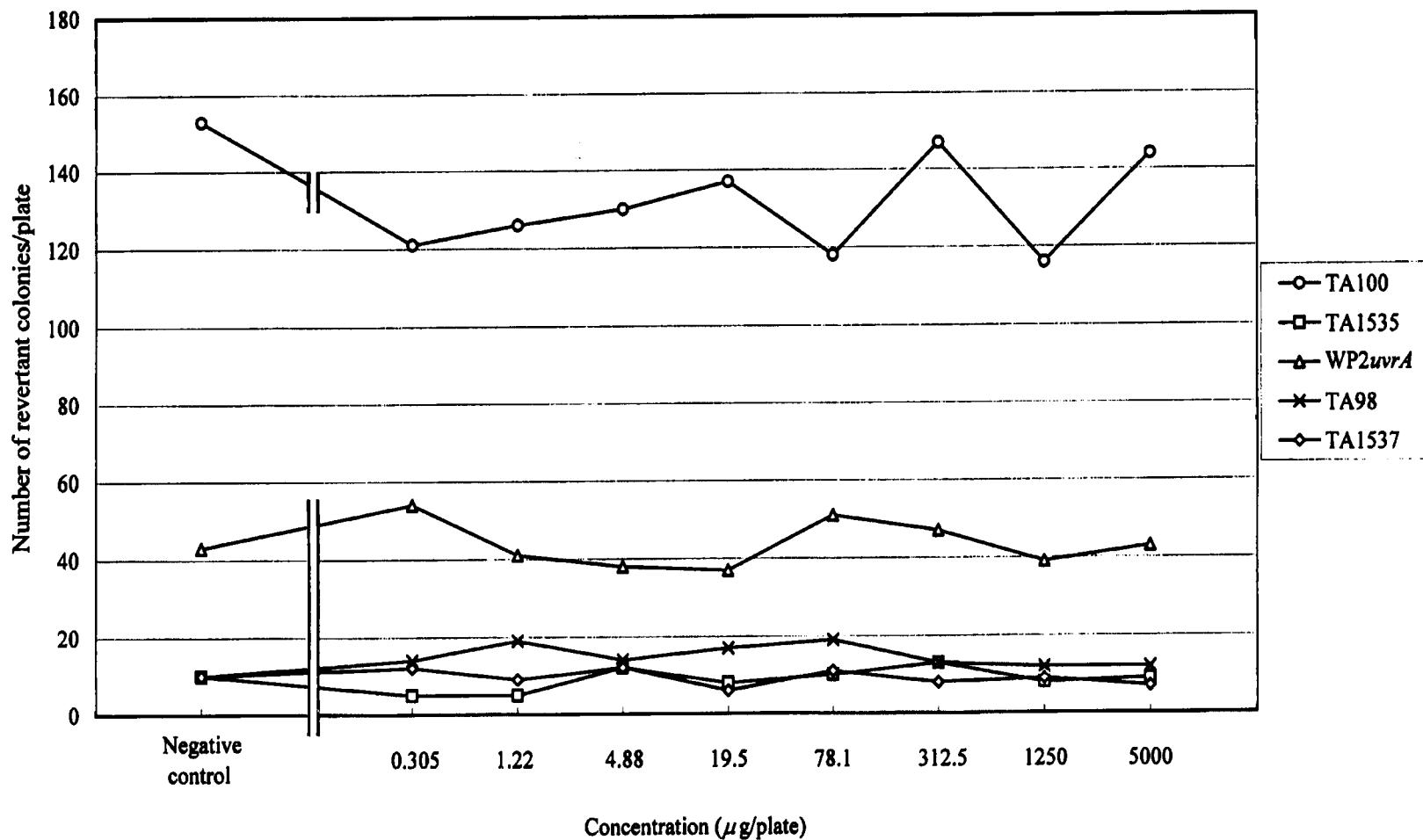


Figure 1-1. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (dose-finding test: -S9 mix).

Study No. 901924

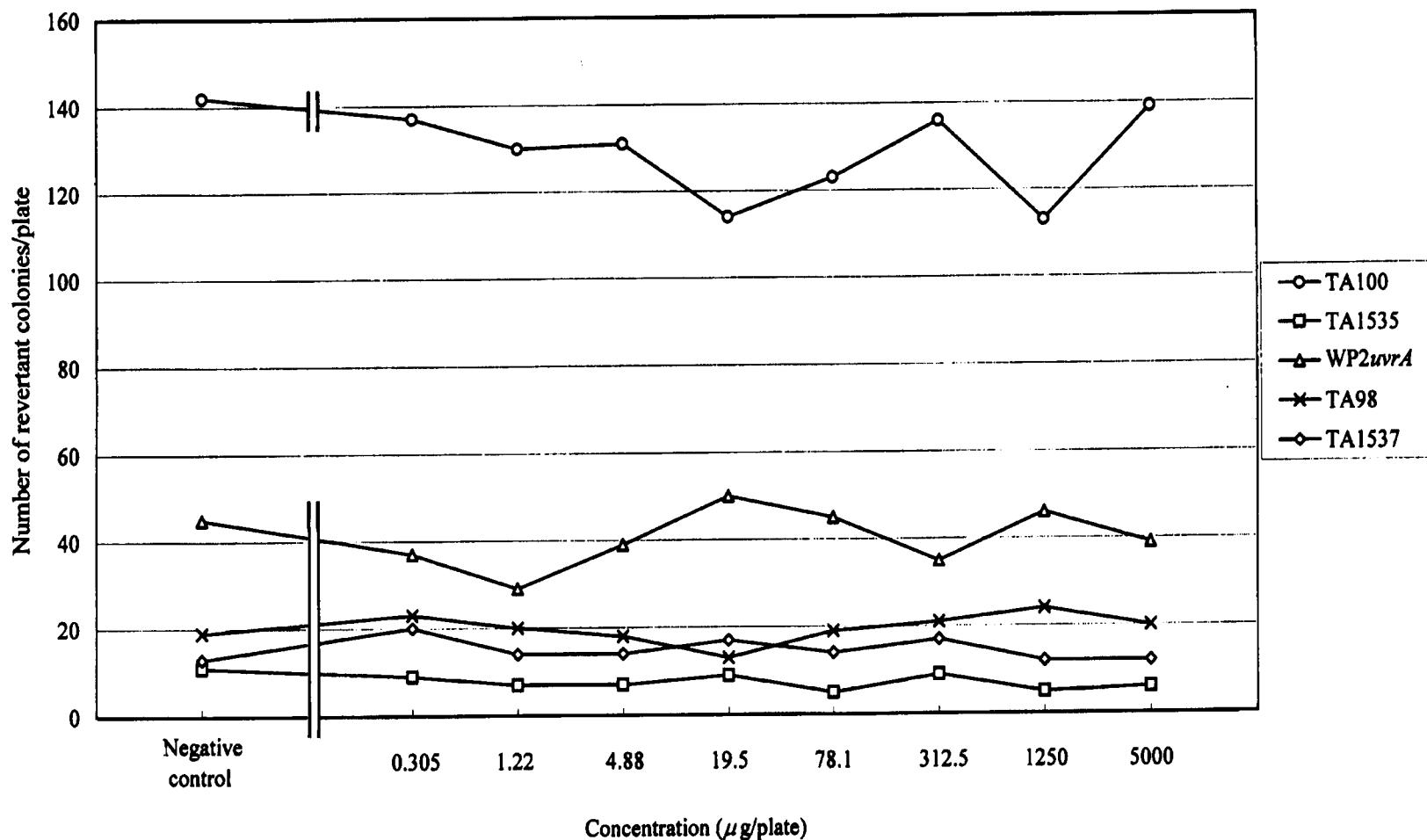


Figure 1-2. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (dose-finding test: +S9 mix).

Study No. 901924

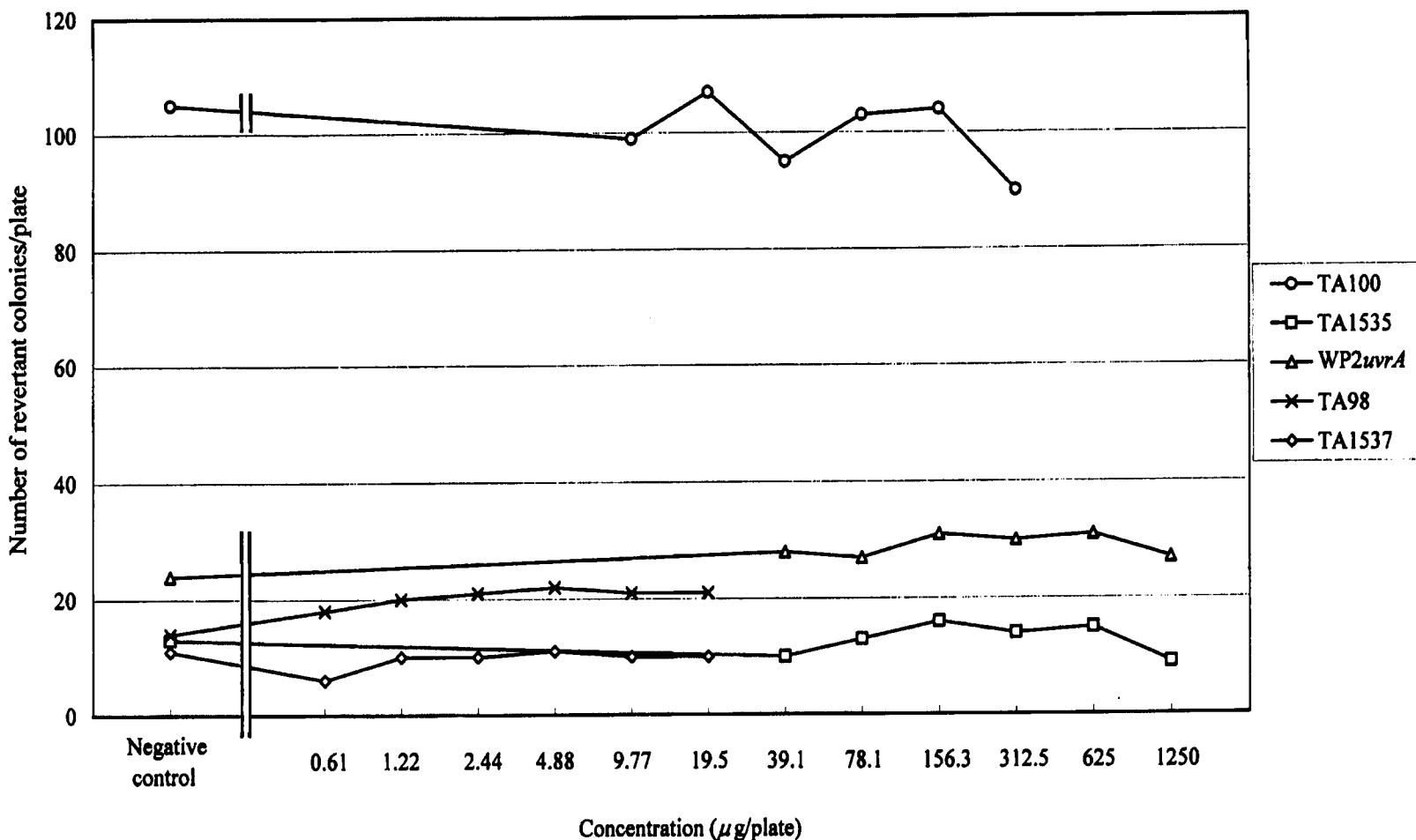


Figure 2-1. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test I: -S9 mix).

Study No. 901924

-05
-06
-07
-08

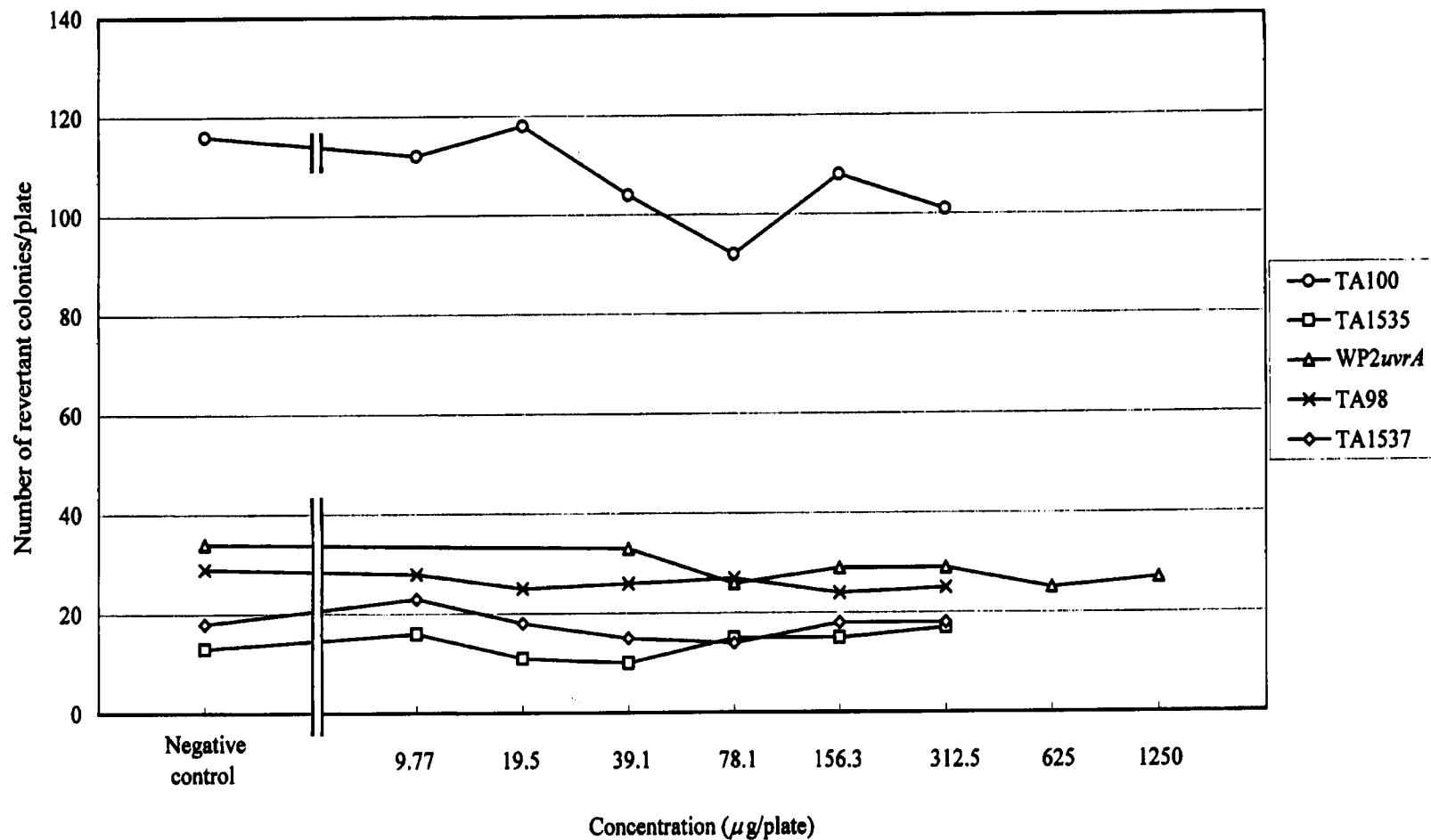


Figure 2-2. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test I: +S9 mix).

Study No. 901924

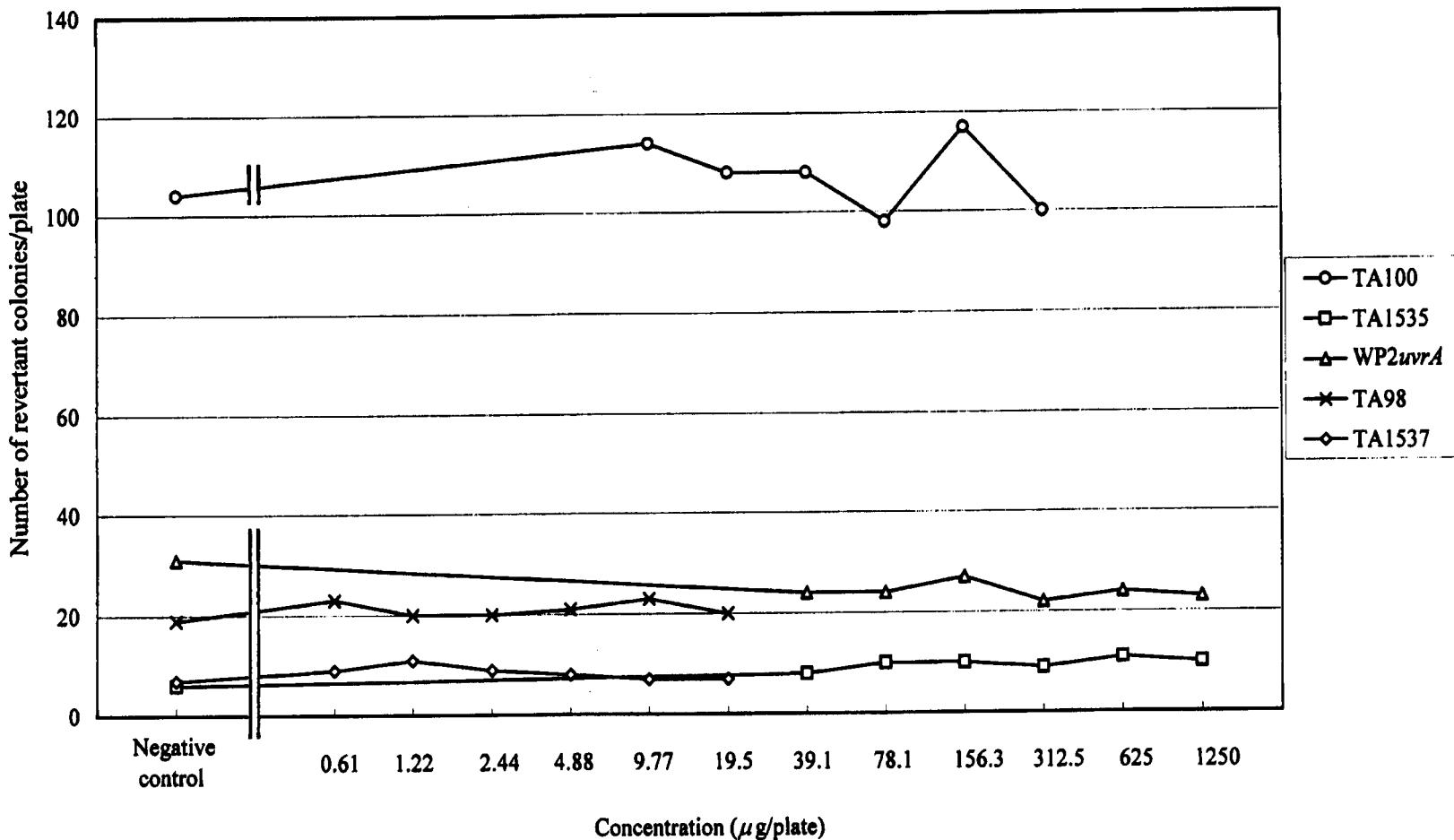


Figure 3-1. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II: -S9 mix).

Study No. 901924

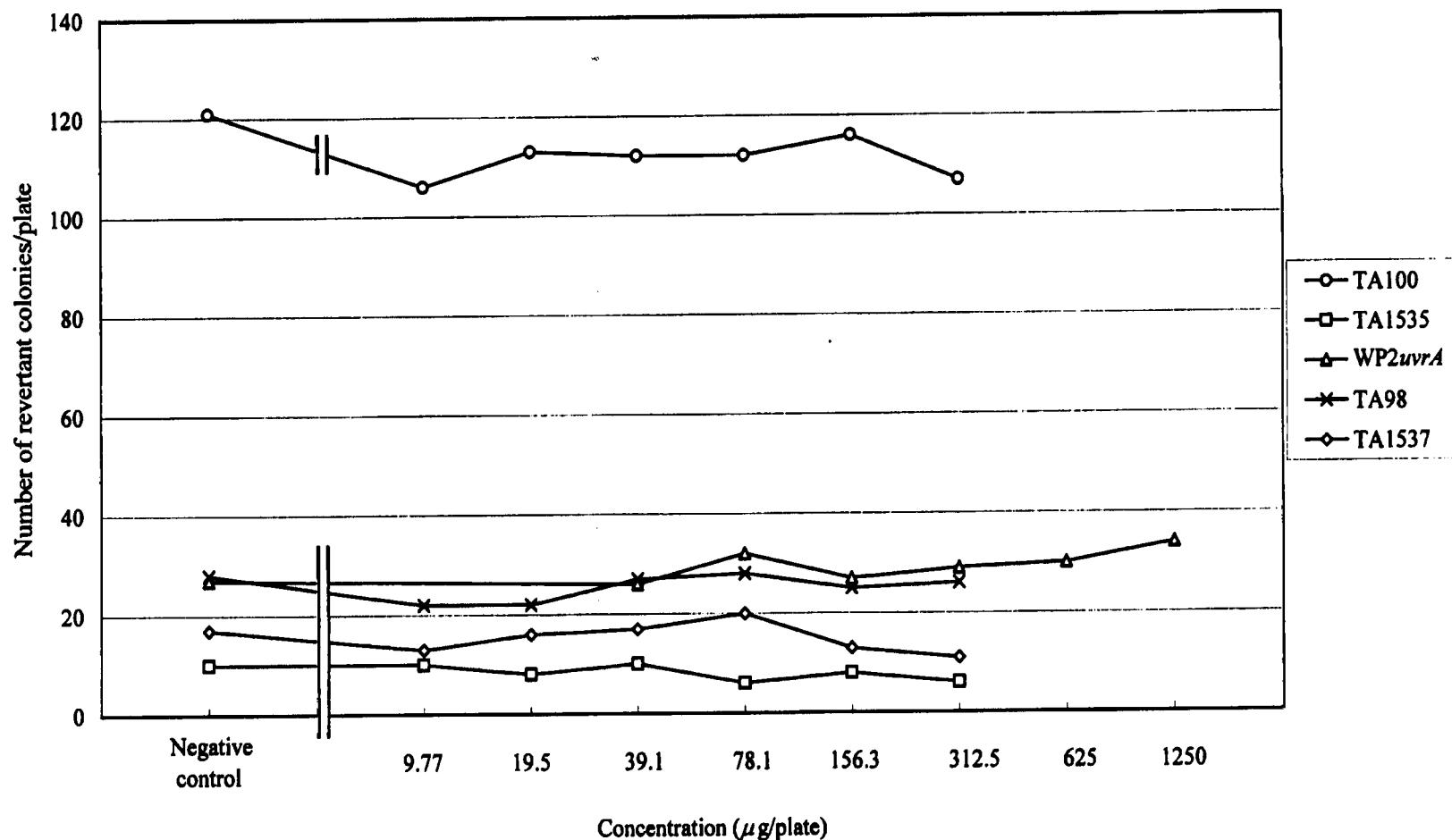


Figure 3-2. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix).

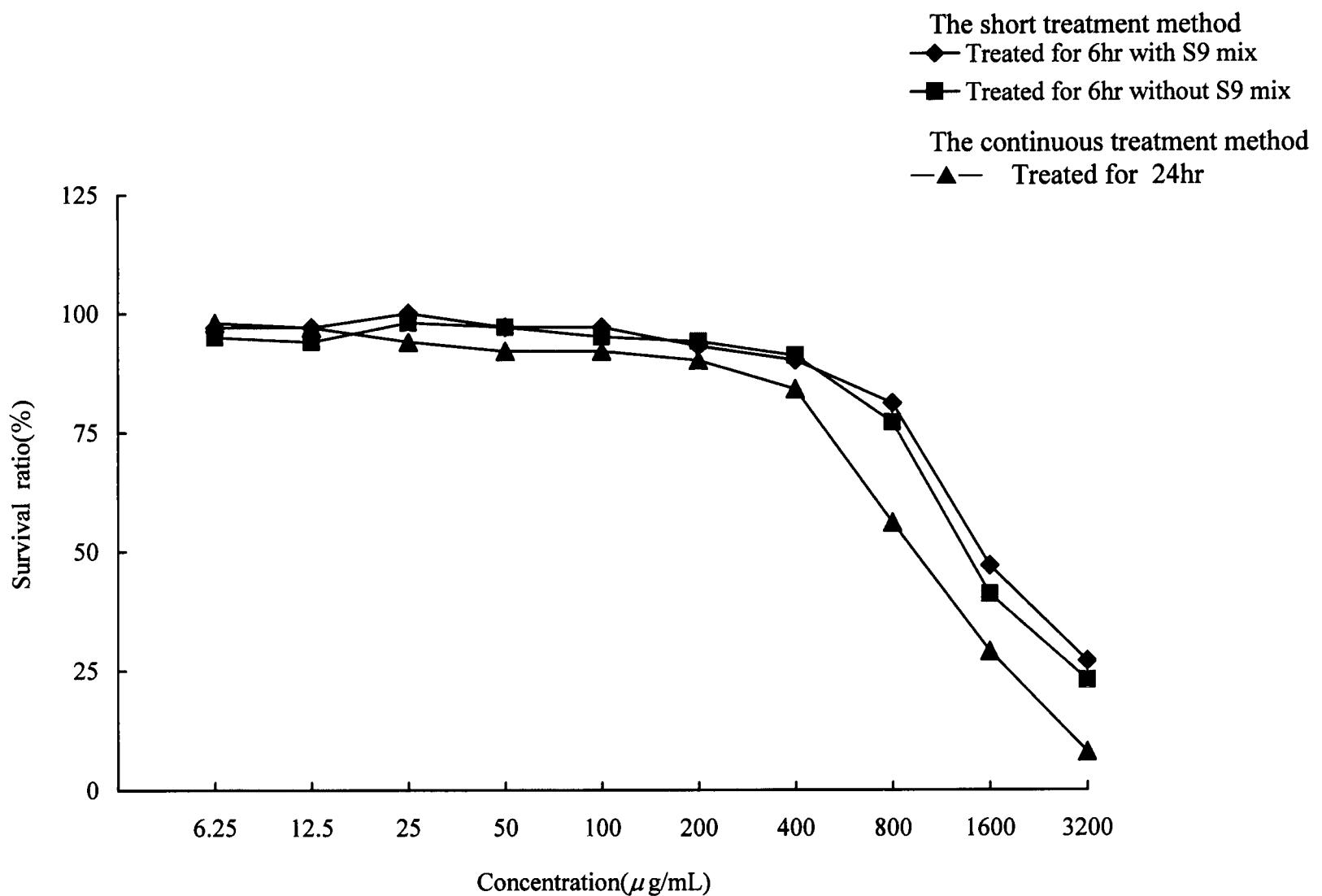


Figure 1. Cell growth inhibition test of bumetizole in cultured CHL cells.

Study No. 971124

**Appendix 1-1. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
-The short treatment method-**

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	Numerical aberration			Judgement ^{b)}	Structural aberrations						Survival ratio ^{e)} (%)		
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)		Types ^{c)} and numbers (cumulative)								
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	-	+	100	0	0	0.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	100
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	
	150*	+	100	0	0	0.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	96
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	
	300*	+	100	0	0	0	-	0	1	0	1	0	0	2	2	91
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	
bumetizole	600*	+	100	0	0	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	85
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	
	1200*	+	100	1	0	1.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	51
			100	2	0			0	0	0	0	0	0	0	0	
	2400*	+	100	2	0	1.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	34
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	
Dimethylnitrosamine	500	+	100	0	0	0	-	0	32	0	63	1	0	73	73	72.5
			100	0	0			0	34	0	61	1	0	72	72	72.5
																+
																85

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; -: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.

e): (bumetizole treated group or positive control / negative control) $\times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Appendix 1-2. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)	
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)			
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
bumetizole	Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	100	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	150*	—	100	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	95
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	300*	—	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	95
			100	0	0			0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5		
	600*	—	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	89
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1200*	—	100	2	0	1.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	48
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	2400*	—	100	0	0	1.0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	34
			100	2	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Mitomycin C	0.1	—	100	0	0	0	—	0	32	0	39	0	0	55	55	52.5	52.5	+	88
			100	0	0	0	—	0	21	0	36	0	0	50	50				

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.e): (bumetizole treated group or positive control / negative control) $\times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Appendix 2. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
—The continuous treatment method—

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	Numerical aberration			Judgement ^{b)}	Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)		
				No. of Polyplloid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)		Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)				
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)			
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	24	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	100	
bumetizole	75*	24	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97	
			100	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	—	—	—	—	
	150*	24	100	1	0	1.0	—	0	0	0	0	1	0	1	1	1.0	1.0	—	92	
			100	1	0		—	0	1	0	0	0	0	0	1	1	—	—	—	
Mitomycin C	300*	24	100	0	0	0.5	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	88	
			100	1	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	62	
	600*	24	100	1	0		—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	34	
			100	2	0		—	0	1	0	0	0	0	0	1	1	—	—	—	
	1200*	24	100	2	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	34	
			100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	34	
Mitomycin C	0.05	24	100	0	0		—	0	20	0	26	0	0	44	44	43.5	43.5	+	88	
			100	0	0	0	—	0	20	0	30	0	0	43	43	—	—	—	—	

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

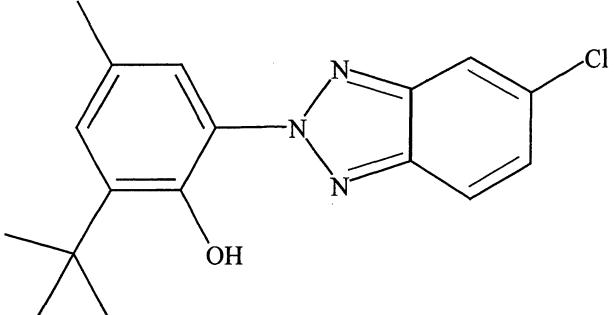
e): (bumetizole treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	ブメトリゾール		
別 名	2-(2'-ヒドロキシ-3-tert-ブチル-5'-メチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール		
C A S 番 号	3896-11-5		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分 子 量	315.80		
試験に供した新規 化学物質の純度	99.9 %		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	01721IW4		
不純物の名称 及び含有率	—		
蒸 気 圧	7.5×10^{-7} Pa (20°C)		
対水溶解度	<1mg/L (20°C) EEC A6		
1-オクタノール/水分配係数	logPow>6 (20-25°C)		
融 点	138-141°C		
沸 点	—		
常温における性状	淡黄色粉末、臭いなし		
安 定 性	常温・常圧で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	DMSO	5 mg/mL以下*	**
備考	<p>* : 試験施設にて溶解度を確認</p> <p>** : 643.2 mg/mL DMSO懸濁液に発熱、発泡は認められず。</p>		

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 細胞の種類一培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	大日本製薬株式会社 ラボラトリープロダクト部
種	チャイニーズハムスター	入手年月日	2000年 11月 28日
培養液	イーグルのMEM粉末を指定の調製方法に従って溶液とし、メンブランで濾過したもの	製造元	GIBCO
血清の種類と添加量	仔牛 10 %	製造元 (Lot No.)	GIBCO (511116)
細胞周期	16.9 h	凍結条件	-196 °C
継代数	15	培養条件	容器 プラスチックシャーレ
染色体数 (モード)	25 本	温度	37 °C
		CO ₂ 濃度	5 %
備考			—

3. S9 mix

(1) S9の入手方法等 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	1.自製 ②購入 (製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2005年 1月 21日製造
購入の場合のLot No.	05012111
保存温度	-80 °C

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質		
種・系統	ラット, Crj:CD (SD)	名 称	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)	
性	雄	投与方法	i.p.	
週齢	7 週	投与期間及び投与量 (g / kg 体重)	1日目 PB 0.03 g/kg 2.3.4日目 PB 0.06 g/kg 3日目 BF 0.08 g/kg	
体重(匹数)	216.4 ± 8.9 g (45匹)			

(3) S 9 mix の組成

成 分	S 9 mix 1mL中の量	成 分	S 9 mix 1mL中の量
S9	0.3 mL	NADP	4 μmoL
MgCl ₂	5 μmoL	Na-リン酸緩衝液	— μmoL
KCl	33 μmoL	その他 (HEPES緩衝液*)	4 μmoL
グルコース-6-リン酸	5 μmoL	注射用水	総量を1mLとする。

* pH 7.2

(4) S 9 mix の処理条件(該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

① プレート法	2. 浮遊細胞法	3. その他 ()
S 9 量 (最終濃度)	5 %	
S 9 蛋白量 (最終濃度)	1.257 mg/mL	
処理時間	6 h	
回復時間	18 h	
備考	—	

4. 被験物質溶液の調製 (被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。)

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度		
	ジメチルスルホキシド	株式会社同仁化学研究所	PU140	紫外外部吸収スペクトラ用	100.0 %		
溶媒選択の理由	ジメチルスルホキシド (DMSO) は、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で一般的に用いられており、良好な懸濁状態となるため。						
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他 ()				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	タッヂミキサーで攪拌することにより均一な懸濁状態とした。						
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	— 時間 — 分 — °C 細胞増殖抑制試験、染色体異常試験（短時間処理法、連続処理法）とも用時調製						
純度換算の有無	有						

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2005年 4月 25日から 2005年 4月 26日	2005年 4月 25日から 2005年 4月 26日
培養器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	1
細胞	播種細胞数	2.0×10^4 個/ 5mL	2.0×10^4 個/ 5mL
	前培養日数	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器	0.015 mL/培養器
	S 9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S 9 の最終濃度		5 %
	S 9 蛋白の最終濃度		1.257 mg/mL
	処理時間	6 h	6 h
	回復時間	18 h	18 h
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (6 - 18 h)		代謝活性化法による場合 (6 - 18 h)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.00625	95	0.00625	97
0.0125	94	0.0125	97
0.025	98	0.025	100
0.050 [†]	97	0.050 [†]	97
0.100 [†]	95	0.100 [†]	97
0.200 [†]	94	0.200 [†]	93
0.400 [†]	91	0.400 [†]	90
0.800 [†]	77	0.800 [†]	81
1.600 [†]	41	1.600 [†]	47
3.200 [†]	23	3.200 [†]	27

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。

[†]代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合とも、0.050 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（白色、微細及び油膜状）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2005年 5月 9日から 2005年 5月 10日	2005年 5月 9日から 2005年 5月 10日
培養器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	2
細胞	播種細胞数	2.0×10^4 個/ 5mL	2.0×10^4 個/ 5mL
	前培養日数	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器	0.015 mL/培養器
	S 9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S 9 の最終濃度		5 %
	S 9 蛋白の最終濃度		1.257 mg/mL
	処理時間	6 h	6 h
	回復時間	18 h	18 h
備考			

(4) 染色体異常試験結果(別表1-1, 1-2による。)

6. 連続処理法による試験

(短時間処理法による試験で陰性と判定された場合に試験を実施すること。)

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		2005年 4月 25日から 2005年 4月 26日	年 月 日から 年 月 日
培養器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培養液量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	
細胞	播種細胞数	2.0×10^4 個/ 5mL	個/ mL
	前培養日数	3 日間	日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処理時間	24 h	h
	回復時間	0 h	h
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24 - 0 h) 処理による場合		(- h) 処理による場合	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100		
0.00625	98		
0.0125	97		
0.025	94		
0.050 [†]	92		
0.100 [†]	92		
0.200 [†]	90		
0.400 [†]	84		
0.800 [†]	56		
1.600 [†]	29		
3.200 [†]	8		

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。

[†]0.050 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（白色の微細及び油膜状の析出物）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		2005年 5月 12日から 2005年 5月 13日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培 養 液 量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/ 5mL	個/ mL
	前 培 養 日 数	3 日間	日間
処 理 条 件	被 驗 物 質 溶 液 添加 量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	h
	回 復 時 間	0 h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表2-1による。)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)	陽性	陰性
-----------------------	----	----

判定の理由

本被験物質は、短時間処理法（代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合）及び連続処理法（24時間処理）とも構造異常・数的異常の出現率は5%未満で、用量に伴う増加も認められなかった。

なお、本試験で用いた陽性対照物質は明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、背景データの範囲内にあり、試験条件を満たすものであったことから、試験系に影響した他の要因がなく、試験が適切に実施されたことが確認された。

また、染色体異常試験と同時に実施した細胞増殖抑制試験の結果を再現し、染色体異常試験が適切な濃度で実施されたことを確認した。

以上の結果より、本被験物質は陰性と判断した。

D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
		連続処理法		—	h処理	—	mg/mL
				—	h処理	—	mg/mL
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
		連続処理法		—	h処理	—	mg/mL
				—	h処理	—	mg/mL

[備考] D₂₀値は分裂中期像20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判定した試験系列について、異常のタイプ別に記入すること。

(2) 参考事項

[用量設定理由]

染色体異常試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために細胞増殖抑制試験を実施した。細胞増殖抑制試験の試験濃度は「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成15年11月21日）に基づき、10mM相当の3.200 mg/mLを最高濃度として、以下公比2で計10濃度を設定した。すなわち、0.00625, 0.0125, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.400, 0.800, 1.600及び3.200 mg/mLとした。

細胞増殖抑制試験の結果から、Probit法で求めた被験物質の50 %細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では1.8649 mg/mL、代謝活性化による場合では2.0209 mg/mLであった。一方、連続処理法(24時間処理)では0.8366 mg/mLであった。このことから、染色体異常試験の試験濃度は、 IC_{50} 及び細胞の生存率を指標に、細胞増殖を50 %以上抑制する濃度を最高濃度とし、公比2により5段階設定した。すなわち、短時間処理法（代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合）では、0.150, 0.300, 0.600, 1.200及び2.400 mg/mLとした。連続処理法(24時間処理)では、0.075, 0.150, 0.300, 0.600及び1.200 mg/mLとした。

[被験物質の析出]

被験物質の析出は、短時間処理法及び連続処理法とも、細胞増殖抑制試験では0.050 mg/mL以上の濃度において認められ、染色体異常試験ではすべての濃度において認められた。

[染色体異常の観察及び結果判定の方法]

1シャーレあたり100個、1濃度あたり200個の分裂中期像を観察した。染色体の異常については、数的異常として倍数体及び核内倍化を記録した。また、構造的異常として染色分体切断、染色分体交換、染色体切断、染色体交換及びその他に分類し、これらの異常を1つでも有する細胞を陽性細胞1個として記録した。

結果の判定は、石館の方法を用いて行った。

[備考] 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

別表 1-1

染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称: ブメトリゾール

処理時間 (hr)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)							ギャップの 出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0)
6-18	-	0.150 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	95	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	1	0	1 (0.5)
6-18	-	0.300 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	95	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0)
6-18	-	0.600 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	89	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	0	0	0 (0)
6-18	-	1.200 [†]	100	1	0	0	0	0	1	0	48	100	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	3	0	3 (1.5)
6-18	-	2.400 [†]	100	0	1	0	0	0	1	0	34	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	2	0	2
			200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0		200	2	0	2 (1.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	32	39	0	0	0	55	0	88	100	0	0	0
			100	21	36	0	0	0	50	0		100	0	0	0
			200	53	75	0	0	0	105 (52.5)	0		200	0	0	0 (0)

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に[†]印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethylsulfoxide
MMC; Mitomycin C

別表 1-2

染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称: ブメトリゾール

処理時間 (hr)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)							ギャップの 出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞 (%)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
			200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	1	0	1 (0.5)
6-18	+	0.150 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	96	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
			200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	1	0	1 (0.5)
6-18	+	0.300 [†]	100	1	1	0	0	0	2	0	91	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	1	0	0	0	2 (1.0)	0		200	0	0	0 (0)
6-18	+	0.600 [†]	100	1	0	0	0	0	1	0	85	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0)
6-18	+	1.200 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	51	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	2	0	2
			200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	3	0	3 (1.5)
6-18	+	2.400 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	34	100	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
			200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	3	0	3 (1.5)
6-18	+	陽性対照 (DMN) 0.500	100	32	63	0	1	0	73	0	85	100	0	0	0
			100	34	61	0	1	0	72	0		100	0	0	0
			200	66	124	0	2	0	145 (72.5)	0		200	0	0	0 (0)

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. 他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethylsulfoxide
D M N ; Dimethylnitrosamine

別表 2-1

染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称：ブメトリゾール

処理時間 (hr)	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)							ギャップの 出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
		200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0)
24-0	0.075 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	97	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	0	0	0 (0)
24-0	0.150 [†]	100	0	0	0	1	0	1	0	92	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	1	0	1
		200	1	0	0	1	0	2 (1.0)	0		200	2	0	2 (1.0)
24-0	0.300 [†]	100	0	1	0	0	0	1	0	88	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
		200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0		200	1	0	1 (0.5)
24-0	0.600 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	62	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	2	0	2
		200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	3	0	3 (1.5)
24-0	1.200 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	34	100	2	0	2
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	2	0	2 (1.0)
24-0	陽性対照 (MMC) 0.00005	100	20	26	0	0	0	44	0	88	100	0	0	0
		100	20	30	0	0	0	43	0		100	0	0	0
		200	40	56	0	0	0	87 (43.5)	0		200	0	0	0 (0)

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に[†]印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethylsulfoxide

MMC; Mitomycin C

図1 細胞増殖抑制試験結果

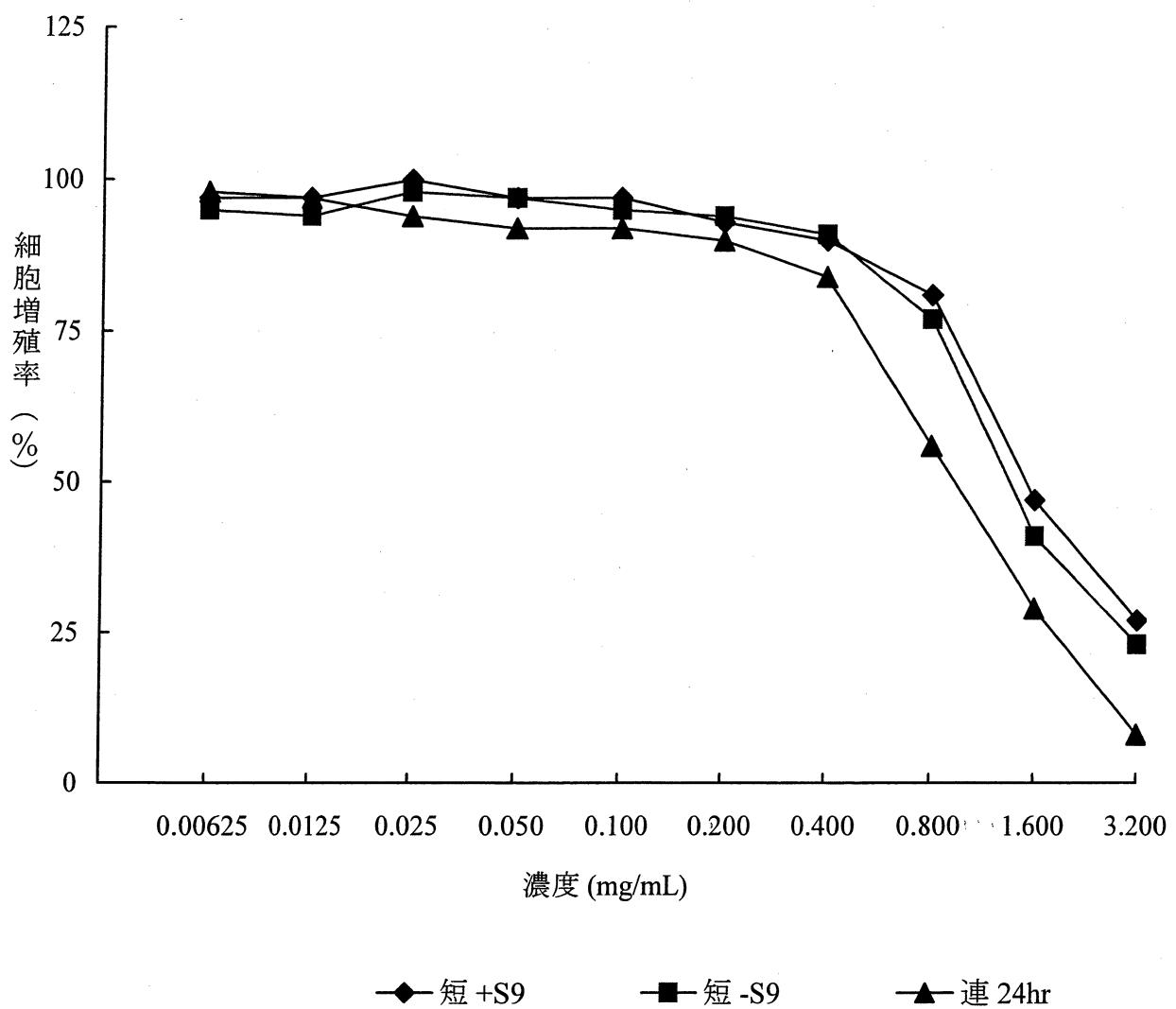
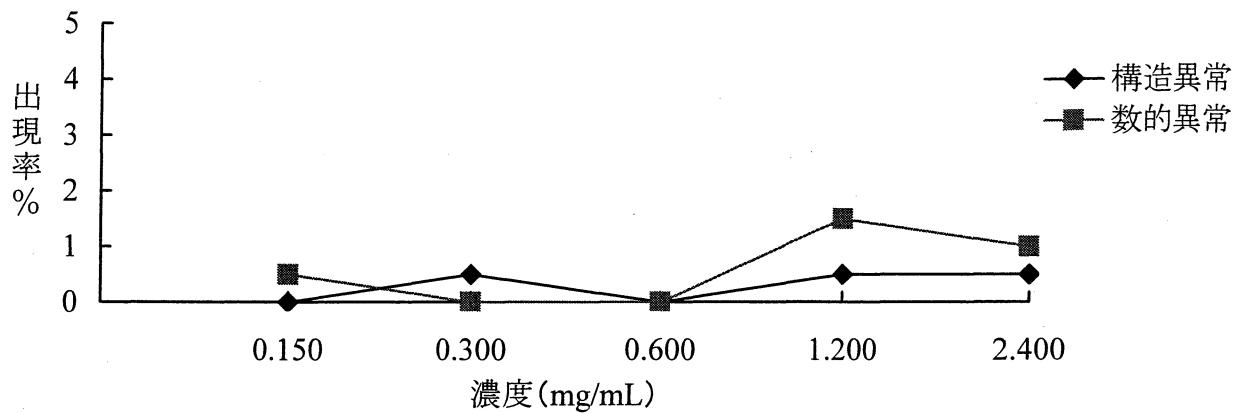


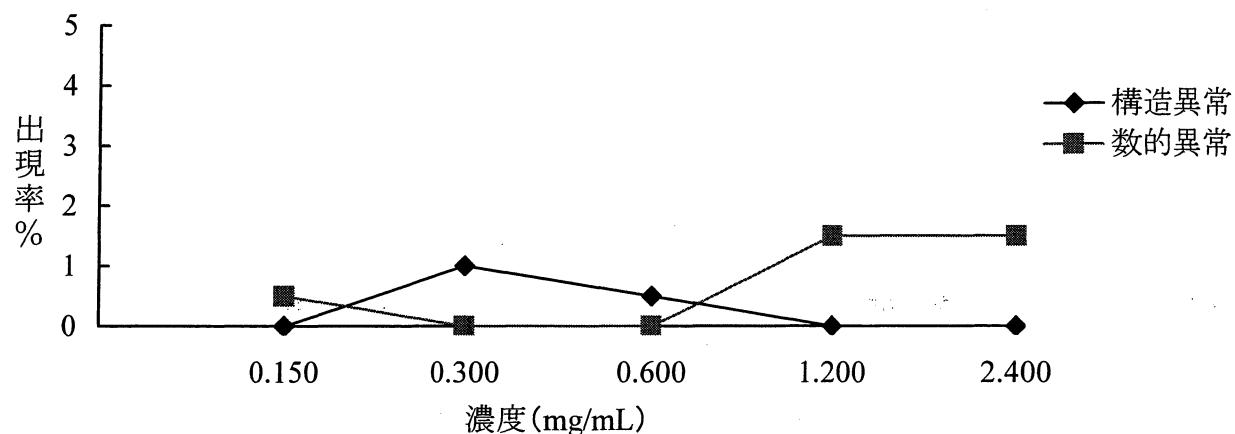
図2 用量反応曲線

Study No. 971124

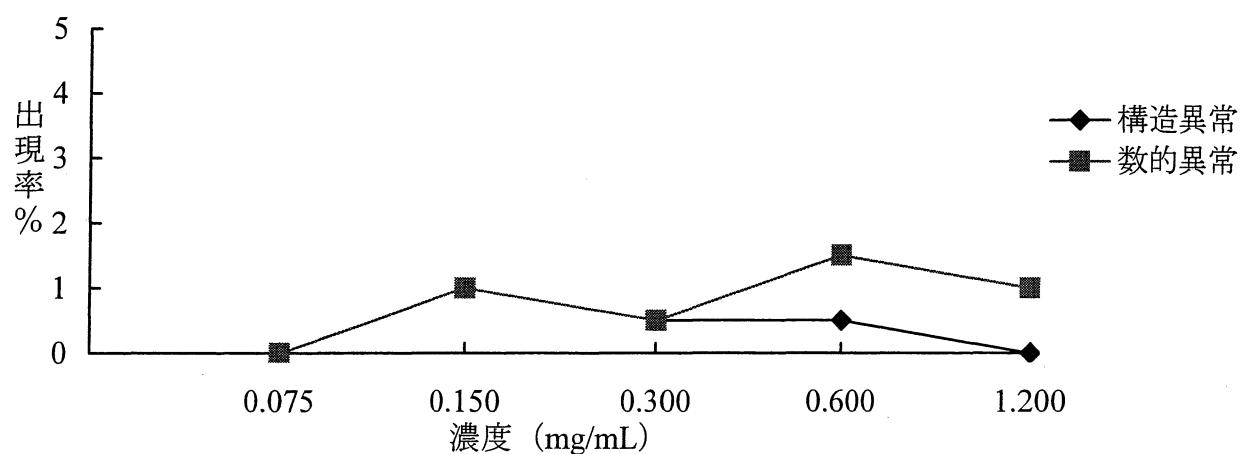
短時間処理法(-S9mix)



短時間処理法(+S9mix)



連続処理法(24hr)



被験物質名：ブメトリゾール (CAS No.3896-11-5)

試験系：チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU細胞)

試験委託者：厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的：ブメトリゾールのは乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無について検討した。

準拠したガイドライン：

「OECD化学品テストガイドライン、473 In vitro 哺乳類動物細胞を用いる染色体異常試験」(1997年7月21日採択)、平成15年11月21日付(薬食発第1121002号：厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・13製局第2号：経済産業省製造産業局長、環保企発第031121002号：環境省総合環境政策局長連名通知)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守したGLP：新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

試験開始日：2005年 4月 1日

試験終了日：2006年 11月 13日

試験実施日：試験系細胞の再培養実施日 (実験開始日) 2005年 4月 15日

細胞増殖抑制試験

細胞播種日	2005年 4月 22日
検体液添加日	2005年 4月 25日
細胞数計測日	2005年 4月 26日

染色体異常試験

1) 短時間処理法

細胞播種日	2005年 5月 6日
検体液添加日	2005年 5月 9日
標本作製及び細胞数計測日	2005年 5月 10日

要 約

ブメトリゾールの染色体異常誘発性の有無を、 ほ乳類の培養細胞(CHL/IU細胞)を用い、 短時間処理法(6時間処理のS9 mix添加及びS9 mix無添加)と連続処理法(24時間処理)で検討した。

ブメトリゾールの試験濃度は、 細胞増殖抑制試験の結果から、 50%細胞増殖抑制濃度及び細胞の生存率を指標に、 短時間処理法(S9 mix添加及びS9 mix無添加)では150, 300, 600, 1200及び2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 連続処理法(24時間処理)では75, 150, 300, 600及び1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の公比2, 5段階を設定した。

試験の結果、 連続処理法及び短時間処理法とも、 数的及び構造的異常細胞の出現率は5%未満であった。各試験系列で用いた陽性対照物質は、 明らかな陽性結果を示し、 陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、 当試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。

以上の結果、 本試験条件下において、 ブメトリゾールに染色体異常誘発性がないと判定する。

Table 1. Cell growth inhibition test of bumetrizole in cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test Substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Treated for 6 hr with S9 mix			Treated for 6 hr without S9 mix		
		No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	70	100	—	64	100	—
bumetrizole	6.25	68	97		61	95	
	12.5	68	97		60	94	
	25	70	100		63	98	
	50*	68	97		62	97	
	100*	68	97		61	95	
	200*	65	93	2020.9	60	94	1864.9
	400*	63	90		58	91	
	800*	57	81		49	77	
	1600*	33	47		26	41	
	3200*	19	27		15	23	

a): (bumetrizole treated group / negative control) $\times 100$.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Table 2. Cell growth inhibition test of bumetizole in cultured CHL cells
-The continuous treatment method-

Test Substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Treated for 24 hr		
		No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^a (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	63	100	—
bumetizole	6.25	62	98	
	12.5	61	97	
	25	59	94	
	50*	58	92	
	100*	58	92	
	200*	57	90	836.6
	400*	53	84	
	800*	35	56	
	1600*	18	29	
	3200*	5	8	

a): (bumetizole treated group / negative control) $\times 100$.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Table 3. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
— The short treatment method —

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations								Survival ratio ^{e)} (%)			
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)					No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)	Judgement ^{b)}			
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)				
Negative control	—	+	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—	100		
bumetizole	150*	+	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	96	
	300*	+	200	0	0	0	—	0	1	0	1	0	0	2	2	1.0	1.0	91	
	600*	+	200	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	85	
	1200*	+	200	3	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	51	
	2400*	+	200	3	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	
Dimethylnitrosamine	500	+	200	0	0	0	—	0	66	0	124	2	0	145	145	72.5	72.5	+	85
bumetizole	Negative control	—	—	200	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	100
	150*	—	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	95
	300*	—	200	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	95
	600*	—	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	89
	1200*	—	200	3	0	1.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	48
	2400*	—	200	2	0	1.0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	34
Mitomycin C	0.1	—	200	0	0	0	—	0	53	0	75	0	0	105	105	52.5	52.5	+	88

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.

e): (bumetizole treated group or positive control / negative control) $\times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Table 4. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
 — The continuous treatment method —

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	Numerical aberration			Judgement ^{b)}	Structural aberrations						Survival ratio ^{e)} (%)						
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)		Types ^{c)} and numbers (cumulative)					No. of cells with chromosome aberration	Incidence ^{d)} (%)	Judgement ^{b)}					
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg							
Negative control	—	24	200	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100	
bumetizole	75*	24	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97
	150*	24	200	2	0	1.0	—	0	1	0	0	1	0	2	2	1.0	1.0	—	92	
	300*	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	88	
	600*	24	200	3	0	1.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	62	
	1200*	24	200	2	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	34	
Mitomycin C	0.05	24	200	0	0	0	—	0	40	0	56	0	0	87	87	43.5	43.5	+	88	

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.

e): (bumetizole treated group or positive control / negative control) $\times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

被験物質名 : 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン(CAS No. 6362-80-7)

試験系 : Crj:CD(SD)IGS 雌ラット(SPF)

試験委託者 : 厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関 1 丁目 2 番 2 号

試験施設 : 株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島 6 丁目 104 番地

試験目的 : 当試験は、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンが人に摂取された場合の健康への影響を推定するために2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンを雌ラットに1回経口投与し、その毒性について検討した。

準拠したガイドライン :

OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (Revised Guideline 423)

遵守したGLP :

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成15年11月21日:薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環保企発第031121004号)及びOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

遵守した動物の福祉に関する法令など :

「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号, 平成11年12月22日改正), 「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号, 平成14年5月28日一部改正), 「動物実験に関する指針」(昭和62年5月22日社団法人日本実験動物学会)及び株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所「動物実験倫理委員会規則」

試験開始日 : 2005年2月16日

試験終了日 : 2007年1月30日

要約

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンを雌ラットに 1 回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は、第 1 回試験及び第 2 回試験を 2000 mg/kg、第 3 回試験及び第 4 回試験を 300 mg/kg とした。媒体にはトウモロコシ油を用いた。使用動物数は各 3 例とした。

1. 死亡状況及び一般状態

死亡例は、第 1 回試験の 2000 mg/kg 投与で投与後 1 日に 1 例と第 2 回試験の 2000 mg/kg 投与で投与後 1 日に 2 例に認められた。

一般状態において、第 1 回試験及び第 2 回試験の 2000 mg/kg 投与で振戦、間代性痙攣、下腹部の汚れあるいは下痢がみられた。第 3 回試験及び第 4 回試験の 300 mg/kg 投与では、異常はみられなかった。

2. 体重

第 1 回試験及び第 2 回試験の 2000 mg/kg 投与では、投与後 1 日に体重増加の抑制がみられた。第 3 回試験及び第 4 回試験の 300 mg/kg 投与では、体重推移に異常はみられなかった。

3. 剖検

第 1 回試験及び第 2 回試験の 2000 mg/kg 投与では、死亡例及び生存例とも剖検所見に異常はみられなかった。第 3 回試験及び第 4 回試験の 300 mg/kg 投与では、剖検所見に異常はみられなかった。

以上の結果から、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの LD₅₀ 値は、300 mg/kg と 2000 mg/kg の間にいると推定される。

<第4回試験>

試験群	投与量(含量)	動物数(動物番号)
2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン	300 mg/kg (30 mg/mL)	3(F01451~F01453)

第3回試験の300 mg/kg 投与で死亡例が認められなかったため、300 mg/kg を第4回試験の投与量とした。

5. 観察及び検査項目

5.1. 観察期間

投与後14日間とした。

5.2. 一般状態

投与日は投与後6時間(投与直後～投与後30分、投与後2, 4及び6時間)まで、投与翌日からの観察期間中は1日1回、一般状態及び死亡の有無を観察した。

5.3. 体重測定

投与日(投与直前)並びに投与後1, 3, 7, 10及び14日に測定した(電子天秤:PG2002-S, メトラー・トレド株式会社)。

5.4. 剖検

死亡動物は、速やかに剖検した。

生存動物は、観察期間終了時にジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

6. 統計解析

LD₅₀値は概略の範囲を推定した。

体重は、各群で平均値及び標準偏差を算出した。

結果

1. 死亡状況、LD₅₀値及び一般状態 (Table 1～2, Appendix 1-1～1-4)

死亡例は、第1回試験の2000 mg/kg 投与で投与後1日に1例と第2回試験の2000 mg/kg 投与で投与後1日に2例に認められた。第3回試験及び第4回試験の300 mg/kg 投与では、死亡例は認められなかった。以上の結果から、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンのLD₅₀値は、300 mg/kg と 2000 mg/kg の間にいると推定される。

一般状態において、第1回試験の2000 mg/kg 投与で投与後4時間に振戦が1例、投与後6時間に振戦及び間代性痙攣が1例、投与後1日に下腹部の汚れが2例と間代性痙攣が1例にみられた。第2回試験の2000 mg/kg 投与で投与後2時間に下痢が1例、投与後4時間に下痢が2例、

投与後 6 時間に下腹部の汚れが 2 例、振戦及び間代性痙攣が 1 例、投与後 1 日に下腹部の汚れが 1 例にみられた。第 3 回試験及び第 4 回試験の 300 mg/kg 投与では、異常はみられなかった。

2. 体重 (Table 3, Appendix 2-1~2-4)

第 1 回試験及び第 2 回試験の 2000 mg/kg 投与では、投与後 1 日に体重増加の抑制がみられたが、投与後 3 日以降の体重は順調に推移した。第 3 回試験及び第 4 回試験の 300 mg/kg 投与では、体重は順調に推移した。

3. 剖検 (Table 4, Appendix 3-1~3-6)

第 1 回試験及び第 2 回試験の 2000 mg/kg 投与による死亡例では、剖検所見に異常はみられなかった。

第 1 回試験及び第 2 回試験の 2000 mg/kg 投与による生存例並びに第 3 回試験及び第 4 回試験の 300 mg/kg 投与による生存例では、剖検所見に異常はみられなかった。

○ 考察

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの LD₅₀ 値は、300 mg/kg と 2000 mg/kg の間と考えられる。

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの 2000 mg/kg 投与により、振戦及び間代性痙攣が認められたことから、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンによる呼吸麻痺あるいは中枢神経の異常により死に至ったと考えられる。

○ 文献

1) 旭化成ファインケム株式会社; MSDS

2) 渡邊ゆかりほか：2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン調製液の安定性確認試験(試験番号：401924P)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)

Table 1 Mortality and LD₅₀ value of female rats in single dose oral toxicity test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene

Group	mg/kg	Number of females	Number of deaths												Total number of deaths	LD ₅₀ (mg/kg)				
			Hours after administration				Days after administration													
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Test group 1 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	2000	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Test group 2 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	2000	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Test group 3 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Test group 4 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 2 General signs of female rats in single dose oral toxicity test of 1,1' - (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Hours after administration				Days after administration											
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Test group 1 1,1' - (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	2000	Number of females	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		Normal	3	3	2	1	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		Tremor	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Clonic convulsions	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled perineal region	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Death	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Test group 2 1,1' - (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	2000	Number of females	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Normal	3	2	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Diarrhea	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tremor	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Clonic convulsions	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled perineal region	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Death	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Test group 3 1,1' - (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	300	Number of females	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Test group 4 1,1' - (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	300	Number of females	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

614

- 20

Table 3 Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of 1,1' - (1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene

Group	Test group 1 1,1'-(1,1-dimethyl-3- methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene	Test group 2 1,1'-(1,1-dimethyl-3- methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene	Test group 3 1,1'-(1,1-dimethyl-3- methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene	Test group 4 1,1'-(1,1-dimethyl-3- methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene
mg/kg	2000	2000	300	300
Number of females	3	3	3	3
Days after administration				
0	181 ± 1	179 ± 4	185 ± 2	181 ± 4
1	187 (2)	186 (1)	205 ± 8	201 ± 3
3	212 (2)	199 (1)	218 ± 5	207 ± 3
7	221 (2)	207 (1)	227 ± 5	217 ± 10
10	232 (2)	212 (1)	236 ± 10	221 ± 14
14	237 (2)	217 (1)	246 ± 13	234 ± 19

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

Table 4 Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene

Group	Test group 1 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	Test group 2 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	Test group 3 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	Test group 4 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene
mg/kg	2000	2000	300	300
Number of surviving females	2	1	3	3
Findings				
Normal	2	1	3	3
Number of dead females	1	2	0	0
Findings				
Normal	1	2	-	-

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene (2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン)		
別名	2,4-Diphenyl-4-methyl-1-pentene		
CAS番号	No. 6362-80-7		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、 その製法の概要)			
分子量	236.36		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	96.97%		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	412220		
不純物の名称 及び含有率	2,4-Diphenyl-4-methyl-2-pentene 2.54%		
蒸気圧	11Pa (170°C)		
対水溶解度	—		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融点	-82°C		
沸点	310°C		
常温における性状	無色透明の液体でスチレン臭がある		
安定性	—		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	—	—	—

【備考】物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「分配係数」の欄には、分配係数、測定温度及び分配係数の測定に用いた溶媒名を記入すること。
- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 急性毒性試験又は反復投与予備試験等

試験 №	試験の種類 及び期間	動物種	1群当たり の動物数	投与 経路	投与量 (mg/kg)	概略の致死量 又はNOEL (mg/kg)	実験場所
1	単回投与毒性試験	ラット Crj:CD (SD) IGS	雌6匹	強制経口 投与	300、2000	GHSのカテルゴリー4に分類される。2000 mg/kg群で死亡例が3/6例に認められたが、300 mg/kg群では死亡例は認められなかった。	(株)日本バイオ リサーチセンター 羽島研究所
2	投与量設定試験 (14日間)	ラット Crl:CD (SD)	雄 5匹	強制経口 投与	0、250、500、 1000	1000 mg/kg群で死亡例が1例に認められ、体重の低値もみられた。500 mg/kg群では、一般状態、体重、摂餌量及び剖検所見に異常はみられなかつた。	(株)日本バイオ リサーチセンター 羽島研究所

* NOEL: no observed effect level

3. 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

1) 反復投与毒性

被験物質投与期間		雄:2005年10月5日～2005年11月15日[計42日間], 雌(試験群):2005年10月5日～2005年11月29日[計44～56日間] 雌(回復群):2005年10月6日～2005年11月16日[計42日間]																	
使用動物種・系統		ラット, Crl:CD(SD)		1群当たりの動物数															
投与経路		強制経口投与		対照群, 低用量群, 中用量群, 高用量群: 雄各12匹, 雌各12匹 (回復群: 対照群, 中用量群, 高用量群: 雌雄各6匹, 低用量群: 雄6匹)															
被験物質の純度 96.97%	投与量		対照群		低用量群		中用量群		高用量群		回復群								
	(mg/kg)		0		45		180		720		0		45		180		720		
	性別		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
体重変化		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	—	
摂餌量		—	—	—	—	—	—	▲ ^{a)f}	△ ^{a)g}	—	—	*	—	—	▽ ^{a)h}	△ ^{a)i}	▲ ^{a)j}	—	
一般状態 (投与期間) (N)		12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	*	6	6	6	6	6	6	
流涎 (N)		—	—	—	—	12 ^{a)}	12 ^{a)}	12 ^{a)}	12 ^{a)}	—	—	*	—	5 ^{a)}	—	—	—	6 ^{a)}	
被毛の汚れ (N)		—	—	—	—	—	—	—	1	4	—	—	*	—	—	—	—	2	
体温下降 (N)		—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	*	—	—	—	—	—	
自発運動の低下 (N)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	1	
鼻の周囲の汚れ (N)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	1	
口の周囲の汚れ (N)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	1	
死亡 (N)		—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	*	—	—	—	—	—	1	
一般状態 (妊娠期間) (N)		*	11	*	12	*	11	*	10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
流涎 (N)		*	—	*	—	*	9 ^{a)}	*	10 ^{a)}	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
被毛の汚れ (N)		*	—	*	—	*	—	*	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
一般状態 (哺育期間) (N)		*	11	*	12	*	11	*	10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
流涎 (N)		*	—	*	—	*	4 ^{a)}	*	10 ^{a)}	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
機能観察所見 (N)		12	12	12	12	12	12	12	12	*	6	*	*	*	6	*	6	*	
FOB 流涎		—	—	△ ^{a)}	—	▲ ^{a)}	—	△ ^{a)}	—	*	*	*	*	*	▲ ^{a)}	*	▲ ^{a)}	*	
立ち上がり回数		—	—	—	—	—	—	—	—	*	*	*	*	*	—	*	—	*	
毛の状態		—	—	—	—	—	—	—	—	*	*	*	*	*	—	*	—	*	
毛づくろい回数		—	—	▽ ^{a)}	—	▽ ^{a)}	—	—	—	*	*	*	*	*	—	*	—	*	
感覚反応		—	—	—	—	—	—	—	—	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
握力		—	—	—	—	—	—	—	—	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
自発運動量		—	—	—	—	—	—	—	—	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
尿所見 (N)		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	
尿量		—	—	—	—	—	—	▲ ^{a)}	↑	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
比重		—	—	—	—	—	—	▼ ^{a)}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
血液学的所見 (N)		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	
赤血球数		—	—	—	—	—	—	—	▽	—	—	*	—	—	—	—	—	—	
ヘマトクリット値		—	—	—	—	—	—	—	▽	—	—	*	—	—	—	—	—	—	
プロトロンビン時間		—	—	▽ ^{a)}	▲	▼ ^{a)}	▲	▼ ^{a)}	▲	▼ ^{a)}	—	—	*	—	—	—	—	—	—
活性化部分トロンボ		—	—	▲	—	—	▲	—	▲	—	—	*	—	—	—	—	—	—	
プラスチニン時間		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	—	
フィブリノーゲン濃度		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	—	
白血球数		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	—	
血液生化学的所見 (N)		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	
AST		—	—	—	—	—	—	—	▼ ^{a)}	—	—	*	—	—	—	—	—	—	
γ-GTP		—	—	—	—	—	—	—	▲	▲	—	—	*	—	—	—	—	—	
総蛋白		—	—	—	—	—	—	—	△	▲	△	—	—	—	—	—	—	—	
アルブミン		—	—	—	—	—	—	—	▲	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
A/G		—	—	—	—	—	—	—	▽ ^{a)}	△	—	—	*	—	—	—	—	—	
総ビリルビン		—	—	—	—	—	—	—	—	△	—	—	*	—	—	—	—	—	
ブドウ糖		—	—	—	—	—	—	—	—	—	▼	—	—	*	—	—	—	—	
総コレステロール		—	—	—	—	—	—	—	—	▲	—	—	—	*	—	—	—	△ ^{a)}	
カリウム		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	—	
塩素		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	▽ ^{a)}	
カルシウム		—	—	—	—	—	—	—	—	▲	—	—	*	—	—	—	—	—	
肉眼的所見		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
生存例 (N)		6	12	6	12	6	12	6	11	6	6	6	6	6	6	6	6	5	
肝臓 癒着 (N)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 ^{a)}	*	—	—	—	—	—	
肉眼的所見		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
死亡例 (N)		*	*	*	*	*	*	*	*	1	*	*	*	*	*	*	*	1	
胸腺 萎縮 (N)		*	*	*	*	*	*	*	*	1	*	*	*	*	*	*	*	1	
脾臓 萎縮 (N)		*	*	*	*	*	*	*	*	1	*	*	*	*	*	*	*	—	
副腎 増大 (N)		*	*	*	*	*	*	*	*	—	*	*	*	*	*	*	*	1	

*: 検査せず。

—: 変化なし, あるいは对照群との間に有意差なし。

↑↓: 傾向, △▽: 5%有意差, ▲▼: 1%有意差。

a): 毒性学的影響ではないと判断, b): 投与4-42日, c): 投与4日, 妊娠0, 14, 21日, d): 投与36日, 回復4日, e): 回復4日,

f): 投与33, 37, 40日, g): 妊娠2日, h): 投与9日, i): 回復2, 12日, j): 投与19, 23, 26日

被験物質の純度 96.97%	投与量 (mg/kg)	対照群		低用量群		中用量群		高用量群		回復群							
		0		45		180		720		0		45		180		720	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
器官重量変化(N) 絶対重量	6	11	—	—	6	10	6	9	6	6	6	*	6	6	6	—	5
	甲状腺	—	—	—	—	△	▲	▲	▲	—	—	△ ^{a)}	*	—	—	—	—
	肝臓	—	—	—	—	▲	▲	▲	—	—	—	—	*	—	—	—	*
	腎臓	—	—	—	—	▲	—	—	—	—	—	—	*	—	—	—	*
	精巣	—	*	—	*	—	*	↑	*	—	—	—	*	—	—	—	—
	卵巢	*	*	—	*	—	*	*	▽ ^{a)}	*	—	—	*	—	—	—	*
	脳	—	—	—	—	—	—	△ ^{a)}	—	—	—	—	—	—	△ ^{a)}	—	—
	下垂体	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	▲	—
	甲状腺	—	—	—	—	—	—	▲	△	—	—	—	—	—	—	—	▲
	肝臓	—	—	—	—	▲	▲	▲	—	—	—	—	—	—	—	—	△
	腎臓	—	—	—	—	▲	—	▲	—	—	—	—	—	—	—	—	*
	精巣	—	*	—	*	—	△	—	*	—	—	—	—	—	—	—	*
投与量 (mg/kg)		0		45		180		720		0		45		180		720	
性別		♂		♂		♂		♂		♂		♂		♂		♂	
Grade		—	±	+~	—	±	+~	—	±	+~	—	±	+~	—	±	+~	
病理組織学的所見 (N)																	
投与期間終了時																	
心臓	細胞浸潤	4	2	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	6	0	0
	肺	血管壁の鉱質沈着	6	0	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3	3 ^{a)}	0
	肝臓	小葉中心性の肝細胞腫大	6	0	0	5	1	0	0	4	2	0	0	0	6	0	6
	肝細胞の好塩基性変化	6	0	0	5	1	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6
	限局性的肝細胞壊死	5	1	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	0
空腸	パイエル板の鉱質沈着	5	1	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	4	2 ^{a)}	0
	腎臓	尿細管上皮の硝子滴	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	3	3	0
	尿細管上皮の変性	6	0	0	6	0	0	5	1	0	5	1	0	5	1	0	0
前立腺	細胞浸潤	3	3	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	6	0	0
	甲状腺	濾胞上皮のびまん性過形成	4	1	1	5	1 ^{a)}	0	3	2 ^{a)}	1 ^{a)}	0	0	1	5	0	5
回復期間終了時																	
肝臓	小葉中心性の肝細胞腫大	6	0	0	6	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0	0	0
	癒着	6	0	0	5	1 ^{a)}	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	0
	腎臓	尿細管上皮の硝子滴	5	1	0	6	0	0	5	1 ^{a)}	0	6	0	0	5	1	0
甲状腺	尿細管上皮の変性	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	5	1	0	0
	濾胞上皮のびまん性過形成	6	0	0	5	1 ^{a)}	0	4	2 ^{a)}	0	3	2 ^{a)}	0	3	3	0	0
	異所性胸腺	6	0	0	5	1 ^{a)}	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	0
性別		♀		♀		♀		♀		♀		♀		♀		♀	
Grade		—	±	+~	—	±	+~	—	±	+~	—	±	+~	—	±	+~	
病理組織学的所見 (N)																	
死亡例																	
全器官・組織	死後変化	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	0	2
	肝臓	小葉中心性の肝細胞腫大	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	0	2
投与期間終了時																	
肝臓	小葉中心性の肝細胞腫大	6	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	6
	肝細胞の好塩基性変化	6	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0
	腎臓	髓外造血	3	3	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	2	4 ^{a)}	0
脾臓	集合管上皮の増生	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	5	0	1	0
	尿細管の拡張	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	5	1	0	0
甲状腺	濾胞上皮のびまん性過形成	6	0	0	4	2 ^{a)}	0	5	1 ^{a)}	0	5	1 ^{a)}	0	3	3	0	0
	小葉中心性の肝細胞腫大	6	0	0	*	*	*	6	0	0	6	0	0	3	2	0	0
回復期間終了時																	
肝臓	小葉中心性の肝細胞腫大	6	0	0	*	*	*	5	1 ^{a)}	0	5	1 ^{a)}	0	5	0	0	0
	嚢胞	6	0	0	*	*	*	5	1 ^{a)}	0	5	1 ^{a)}	0	5	0	0	0
NOEL		雄: 45 mg/kg/day 未満. 雌: 45 mg/kg/day.															
NOEL の推定根拠とした変化		雄では、45 mg/kg 投与で肝臓の絶対重量及び相対重量の高値並びに小葉中心性の肝細胞腫大及び肝細胞の好塩基性変化が認められたため。 雌では、180 mg/kg 投与で肝臓の絶対重量及び相対重量の高値並びに小葉中心性の肝細胞腫大及び肝細胞の好塩基性変化が認められたため。															

* NOEL: no observed effect level

—: 変化なし, あるいは対照群との間に有意差なし. ±: ごく軽度, +~: 軽度, 中等度, 高度.

↑↓: 傾向. △▽: 5%有意差. ▲▼: 1%有意差.

a): 毒性学的影響ではないと判断

2) 生殖発生毒性

投与量 (mg/kg)	対照群 0	低用量群 45	中用量群 180	高用量群 720
親動物				
発情回数	3.5	3.3	3.4	2.9 ↓
交尾率(%)	100.0	100.0	100.0	100.0
受胎率(%)	91.7	100.0	91.7	90.9
妊娠黄体数	15.9	14.7	15.7	12.2 ▼
着床数	14.9	14.1	14.8	9.1 ▼
着床率(%)	93.8	96.2	94.3	74.1 ↓
妊娠母獣数	11	12	11	10
生児出産母獣数	11	12	11	10
出産率(%)	100.0	100.0	100.0	100.0
妊娠期間	22.1	22.1	22.0	22.5
新生児				
総出産児数	13.7	13.4	14.2	8.0 ▼
分娩率(%)	90.2	94.2	95.8	79.9 ↓
児の出産率(%)	90.4	94.2	95.8	80.0 ↓
生存児数 (哺育 0 日)	13.5	13.3	14.2	7.2 ▼
出生率(%)	98.2	98.6	100.0	92.1
性比 (♂/♀, 哺育 0 日)	0.96	1.00	1.03	1.13
生存児数 (哺育 4 日)	13.4	12.9	12.8	7.0 ▼
生存率(%)	99.2	97.4	90.3	90.0
性比 (♂/♀, 哺育 4 日)	0.94	1.00	1.01	1.14
体重 (哺育 0 日)		-/-	-/-	▲/↑
体重 (哺育 4 日)		-/-	-/-	▲/↑
外表異常所見	-	-	-	-
剖検所見	-	-	-	-
NOEL	親動物: 雄 180 mg/kg/day. 雌 180 mg/kg/day. 児動物: 180 mg/kg/day.			
NOEL の推定根拠とした変化	雄では、720 mg/kg 投与で精巣重量に影響が認められたため。 雌では、720 mg/kg 投与で性周期、妊娠黄体数、着床数及び着床率に影響が認められたため。 児動物では、720 mg/kg 投与で総出産児数、哺育 0 日の新生児数、分娩率、児の産出率及び哺育 4 日の生存児数、雌雄体重に影響が認められたため。			

* NOEL: no observed effect level

-/-: ♂/♀

交尾率(%) = (交尾確認動物数 / 交配動物数) × 100

受胎率(%) = (妊娠確認動物数 / 交尾確認動物数) × 100

着床率(%) = (着床数 / 妊娠黄体数) × 100

出産率(%) = (新生児出産母獣数 / 妊娠母獣数) × 100

妊娠期間 = 哺育 0 日 [分娩確認日] (年月日) - 妊娠 0 日 (年月日)

分娩率(%) = (総出産児数 / 着床数) × 100

児の出産率(%) = (哺育 0 日 新生児数 / 着床数) × 100

出生率(%) = (哺育 0 日 生存児数 / 総出産児数) × 100

生存率(%) = (哺育 4 日 生存児数 / 哺育 0 日 生存児数) × 100

-: 変化なし, あるいは対照群との間に有意差なし.

↑↓: 傾向. ▲▼: 1%有意差.

被験物質名：2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン(CAS No.6362-80-7)

試験系：Crl:CD(SD)雌雄ラット(SPF)

試験委託者：厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関 1 丁目 2 番 2 号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島 6 丁目 104 番地

試験目的：当試験は、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンが継続的に人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンを雌雄ラットに反復経口投与し、毒性学的影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎及び分娩などの雌雄動物の生殖行動に及ぼす影響を検討した。

準拠したガイドライン：

OECD Guideline for Testing of Chemicals for Combined Repeat Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (422)

遵守した GLP：

新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準

(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号)

OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE

(OECD 化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

遵守した動物の福祉に関する法令など：

「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 11 年 12 月 22 日改正)、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号、平成 14 年 5 月 28 日一部改正)、「動物実験に関する指針」(昭和 62 年 5 月 22 日社団法人日本実験動物学会)及び株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所「動物実験倫理委員会規則」

試験開始日：2005 年 8 月 25 日

試験終了日：2007 年 1 月 30 日

要約

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する一般毒性学的影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎及び分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、720 mg/kg を高用量とし、以下 180 及び 45 mg/kg とした。対照として媒体(トウモロコシ油)投与群を設けた。各群の使用動物数は試験群を雌雄各 12 例とし、雄では各群ともそのうち半数を回復群とした。雌では、試験群とは別に対照群、180 及び 720 mg/kg 群に各 6 例の回復群を設けた。

I. 反復投与毒性

1. 一般状態及び死亡状況

死亡例は、720 mg/kg 群で試験群雌 1 例(投与 9 日)と回復群雌 1 例(投与 14 日)に認められた。720 mg/kg 群の死亡例で被毛の汚れ、自発運動の低下、体温下降、鼻周囲の汚れあるいは口周囲の汚れがみられた。720 mg/kg 群の雌雄の生存例では、被毛の汚れがみられた。なお、雌雄とも 720 及び 180 mg/kg 群で投与直後に一過性の流涎がみられたが、毒性症状とはみなさなかつた。

2. 体重及び摂餌量

体重は、720 mg/kg 群の雄で投与期間を通して低値、雌で交配開始前に一過性の低値、妊娠 0, 14 及び 21 日に低値がみられた。回復期間には、雄の体重は回復した。摂餌量は、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

3. 行動機能 (FOB) 観察、感覚反応検査、握力測定及び自発運動量測定

行動機能 (FOB)、感覚反応、握力及び自発運動量では、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

4. 尿検査、血液学検査及び血液生化学検査

尿検査において、投与期間終了時に雄では 720 mg/kg 群で尿量の高値及び尿比重の低値、雌では 720 mg/kg 群で尿量の高値傾向がみられた。回復期間終了時には、雌雄とも投与に起因する変化は認められなかった。

血液学検査において、投与期間終了時に雄では 720 及び 180 mg/kg 群でプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長、720 mg/kg 群でフィブリノーゲン濃度の高値、雌では 720 mg/kg 群で赤血球数及びヘマトクリット値の低値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長がみられた。回復期間終了時には、雌雄とも投与に起因する変化は認められなかつた。

血液生化学検査において、投与期間終了時に雄では 720 mg/kg 群で γ -GTP、総蛋白、アルブミン、A/G、総ビリルビン、総コレステロール及び Ca の高値並びに Cl の低値、180 mg/kg 群で Ca の高値、雌では 720 及び 180 mg/kg 群で総蛋白の高値、720 mg/kg 群でブドウ糖の低値、 γ -GTP

及び総ビリルビンの高値がみられた。回復期間終了時には、雄では 720 mg/kg 群で γ -GTP の高値がみられたが、雌では投与に起因する変化は認められなかった。

5. 剖検所見及び器官重量

剖検において、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

器官重量において、投与期間終了時に雄では 720, 180 及び 45 mg/kg 群で肝臓の絶対重量及び相対重量の高値、720 及び 180 mg/kg 群で腎臓の絶対重量及び相対重量の高値、720 mg/kg 群で甲状腺及び精巣の絶対重量及び相対重量の高値傾向あるいは高値、雌では 720 及び 180 mg/kg 群で肝臓の絶対重量及び相対重量の高値、720 mg/kg 群で甲状腺の絶対重量及び相対重量の高値傾向あるいは高値がみられた。回復期間終了時には、雄では 720 mg/kg 群で肝臓、腎臓及び甲状腺の絶対重量及び相対重量の高値あるいは高値傾向、雌では 720 mg/kg 群で肝臓及び腎臓の絶対重量及び相対重量の高値あるいは高値傾向がみられた。

6. 病理組織学検査

投与期間終了時には、雄では肝臓にごく軽度～中等度の小葉中心性の肝細胞腫大が 720 及び 180 mg/kg 群の 6 例全例と 45 mg/kg 群の 1 例、ごく軽度又は軽度の肝細胞の好塩基性変化が 720 及び 180 mg/kg 群の 6 例全例と 45 mg/kg 群の 1 例、腎臓にごく軽度の尿細管上皮の硝子滴が 720 mg/kg 群の 3 例及びごく軽度の尿細管上皮の変性が 720 及び 180 mg/kg 群の各 1 例、甲状腺にごく軽度又は軽度の濾胞上皮のびまん性過形成が 720 mg/kg 群の 6 例全例にみられた。ごく軽度又は軽度の甲状腺の濾胞上皮のびまん性過形成は、180 mg/kg 群の 3 例、45 mg/kg 群の 1 例と対照群の 2 例にみられたが、偶発例と判断した。雌では、肝臓にごく軽度又は軽度の小葉中心性の肝細胞腫大が 720 及び 180 mg/kg 群の 6 例全例、ごく軽度の肝細胞の好塩基性変化が 720 及び 180 mg/kg 群の 6 例全例、腎臓に軽度の集合管上皮の増生及びごく軽度の尿細管の拡張が 720 mg/kg 群の 1 例、甲状腺にごく軽度の濾胞上皮のびまん性過形成が 720 mg/kg 群の 3 例にみられた。甲状腺のごく軽度の濾胞上皮のびまん性過形成は、180 mg/kg 群の 1 例と 45 mg/kg 群の 2 例にみられたが、偶発例と判断した。

回復期間終了時には、雄では肝臓にごく軽度の小葉中心性の肝細胞腫大が 720 mg/kg 群の 6 例全例と 180 mg/kg 群の 1 例、腎臓にごく軽度の尿細管上皮の変性が 720 mg/kg 群の 1 例、甲状腺にごく軽度の濾胞上皮のびまん性過形成が 720 mg/kg 群の 3 例、180 mg/kg 群の 2 例と 45 mg/kg 群の 1 例にみられた。甲状腺の濾胞上皮のびまん性過形成は、720 mg/kg 群でその頻度は高かった。雌では、肝臓にごく軽度の小葉中心性の肝細胞腫大が 720 mg/kg 群の 2 例にみられた。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物の生殖発生に及ぼす影響

720 mg/kg 群では、交配開始前の投与期間(14 日間)の発情回数、妊娠黄体数、着床数及び着床率の低値あるいは低値傾向がみられた。交尾率、交尾所要日数、受胎雌数、受胎率、妊娠期間、出産率、分娩状態及び哺育状態には、投与に起因する変化はみられなかった。

2. 児動物 (F_1) に及ぼす影響

720 mg/kg 群では、総出産児数、哺育 0 日の新生児数、分娩率、児の産出率及び哺育 4 日の生存児数の低値あるいは低値傾向がみられた。また、720 mg/kg 群では、哺育 0 及び 4 日の雌雄平均体重及び一腹平均体重の高値あるいは高値傾向、哺育 0 及び 4 日の一腹合計体重の低値がみられた。一般状態、外表及び剖検において、投与に起因する変化はみられなかった。

以上のように、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの無影響量は、雄では 45 mg/kg 投与で肝臓の絶対重量及び相対重量の高値並びに小葉中心性の肝細胞腫大及び肝細胞の好塩基性変化が認められたことから 45 mg/kg/day 未満、雌では 180 mg/kg 投与で肝臓の絶対重量及び相対重量の高値並びに小葉中心性の肝細胞腫大及び肝細胞の好塩基性変化が認められたことから 45 mg/kg/day と考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雄では 720 mg/kg 投与で精巣重量に影響が認められたことから 180 mg/kg/day、雌では 720 mg/kg 投与で性周期、妊娠黄体数、着床数及び着床率に影響が認められたことから 180 mg/kg/day と考えられる。児動物への無影響量は、720 mg/kg 投与で総出産児数、哺育 0 日の新生児数、分娩率、児の産出率及び哺育 4 日の生存児数、雌雄体重に影響が認められたことから 180 mg/kg/day と考えられる。

結果

I. 反復投与毒性

1. 一般状態

1.1. 雄 (Table 1-1～1-5, Appendix 1-1～1-4)

死亡例及び瀕死例は、いずれの群にも認められなかった。

投与期間中には、720 mg/kg 群では投与直後に一過性の流涎が 12 例全例及び被毛の汚れが 1 例にみられた。180 mg/kg 群では、投与直後に一過性の流涎が 12 例全例にみられた。45 mg/kg 群及び対照群では、一般状態の異常はみられなかった。

回復期間中には、いずれの群とも一般状態の異常はみられなかった。

1.2. 試験群雌 (Table 2-1, 2-2, 3-1, 3-2 及び 4, Appendix 2-1～2-4, 3-1～3-4 及び 4-1～4-4)

720 mg/kg 群では、投与 9 日に 1 例(No. F04457)が死亡した。180 及び 45 mg/kg 群並びに対照群では、死亡例及び瀕死例は認められなかった。

720 mg/kg 群の死亡例(No. F04457)において、投与 2～7 日の投与直後に一過性の流涎、投与 4～8 日に被毛の汚れ、投与 5～8 日に体温下降及び投与 8 日に自発運動の低下がみられた。

交配開始前及び交配期間中には、720 mg/kg 群の生存例では投与直後に一過性の流涎が 11 例全例及び被毛の汚れが 3 例にみられた。180 mg/kg 群では、投与直後に一過性の流涎が 12 例全例にみられた。45 mg/kg 群及び対照群では、一般状態の異常はみられなかった。

妊娠期間中には、720 mg/kg 群では投与直後に一過性の流涎が 10 例全例及び被毛の汚れが 1 例にみられた。180 mg/kg 群では、投与直後に一過性の流涎が 9 例にみられた。45 mg/kg 群及び対照群では、一般状態の異常はみられなかった。

哺育期間中には、720 mg/kg 群では投与直後に一過性の流涎が 10 例全例にみられた。180 mg/kg 群では、投与直後に一過性の流涎が 4 例にみられた。45 mg/kg 群及び対照群では、一般状態の異常はみられなかった。

1.3. 回復群雌 (Table 5-1～5-5, Appendix 5-1～5-3)

720 mg/kg 群では、投与 14 日に 1 例(No. F04476)が死亡した。180 mg/kg 群及び対照群では、死亡例及び瀕死例は認められなかった。

720 mg/kg 群の死亡例(No. F04476)において、投与 3, 5, 6, 8～10 日の投与直後に一過性の流涎、投与 2, 11～13 日に被毛の汚れ、投与 13 日に自発運動の低下、鼻周囲の汚れ及び口周囲の汚れがみられた。

投与期間中には、720 mg/kg 群の生存例では投与直後に一過性の流涎が 5 例全例及び被毛の汚れが 1 例にみられた。180 mg/kg 群では、投与直後に一過性の流涎が 5 例にみられた。対照群では、一般状態の異常はみられなかった。

回復期間中には、一般状態の異常はいずれの群にもみられなかった。

2. 体重

2.1. 雄 (Table 6, Fig.2, Appendix 6-1~6-4)

投与期間中には、720 mg/kg 群では対照群と比べて投与 4~42 日に体重の有意な低値がみられた。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

回復期間中には、720 mg/kg 群では対照群と比べて回復 4 日に体重の有意な低値がみられた。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

2.2. 試験群雌 (Table 7~9, Fig.3, Appendix 7-1~7-4, 8-1~8-4 及び 9-1~9-4)

交配開始前及び交配期間中には、720 mg/kg 群では対照群と比べて投与 4 日に体重の有意な低値がみられた。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

妊娠期間中には、720 mg/kg 群では対照群と比べて妊娠 0, 14 及び 21 日に体重の有意な低値がみられた。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

哺育期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

2.3. 回復群雌 (Table 10, Fig.4, Appendix 10-1~10-3)

投与期間中には、720 mg/kg 群では対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。180 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 36 日に体重の有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

回復期間中には、720 mg/kg 群では対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。180 mg/kg 群では、対照群と比べて回復 4 日に体重の有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

3. 摂餌量

3.1. 雄 (Table 11, Fig.5, Appendix 11-1~11-4)

投与期間中には、720 mg/kg 群では対照群と比べて投与 33, 37 及び 40 日に摂餌量の有意な高値がみられたが、体重変化を伴わないことから、毒性学的影響とは考えられない。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

回復期間中には、720 mg/kg 群では対照群と比べて回復 2 及び 12 日に摂餌量の有意な高値がみられたが、体重変化を伴わすことから、毒性学的影響とは考えられない。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

3.2. 試験群雌 (Table 12~14, Fig.6, Appendix 12-1~12-4, 13-1~13-4 及び 14-1~14-4)

交配開始前には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

妊娠期間中には、720 mg/kg 群では対照群と比べて妊娠 2 日に摂餌量の有意な高値がみられたが、一過性の変化であり、体重変化を伴わすことから、毒性学的影響とは考えられない。

180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

哺育期間中には、各投与群とも対照群と比べて測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

3.3. 回復群雌 (Table 15, Fig.7, Appendix 15-1～15-3)

投与期間中には、720 mg/kg 群では対照群と比べて投与 19, 23 及び 26 日に摂餌量の有意な高値がみられたが、体重変化を伴わないことから、毒性学的影響とは考えられない。180 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 9 日に摂餌量の有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

回復期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

4. 行動機能 (FOB)

4.1. 雄 (Table 16-1～16-6, Appendix 16-1～16-4)

720 及び 180 mg/kg 群では、流涎がみられ、対照群と比べて 720 mg/kg 群で投与 7, 14, 21, 28, 35 及び 41 日と 180 mg/kg 群で投与 21 及び 41 日にその出現率の有意な高値がみられたが、投与直後の一過性の流涎が継続したものと考えられる。また、720 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 7 日に立ち上がり回数の有意な低値がみられたが、一過性の変化であること、他の観察項目に異常は認められることから、毒性学的影響とは考えられない。45 mg/kg 群では、各測定日のいずれの項目にも異常はみられなかった。

4.2. 試験群雌 (Table 17-1～17-6, Appendix 17-1～17-4)

720 及び 180 mg/kg 群では、流涎がみられ、対照群と比べて 720 mg/kg 群で投与 8 及び 15 日、妊娠 1, 8 及び 15 日並びに哺育 3 日にその出現率の有意な高値がみられたが、投与直後の一過性の流涎が継続したものと考えられる。また、720 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 8 日に毛の状態の有意な高値がみられたが、投与前に観察された被毛の汚れが継続したものと考えられる。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて哺育 3 日に毛づくろい回数の有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

4.3. 回復群雌 (Table 18-1～18-6, Appendix 18-1～18-3)

720 及び 180 mg/kg 群では、流涎がみられ、対照群と比べて 720 mg/kg 群で投与 8, 15, 29 及び 36 日と 180 mg/kg 群で投与 29 日にその出現率の有意な高値がみられたが、投与直後の一過性の流涎が継続したものと考えられる。

5. 感覚反応

5.1. 雄 (Table 19, Appendix 19-1～19-4)

各投与群とも、いずれの項目にも異常はみられなかった。

5.2. 試験群雌 (Table 20, Appendix 20-1～20-4)

各投与群とも、いずれの項目にも異常はみられなかった。

6. 握力

6.1. 雄 (Table 21, Appendix 21-1~21-4)

各投与群とも、対照群と比べて前肢及び後肢の握力に有意差はみられなかった。

6.2. 試験群雌 (Table 22, Appendix 22-1~22-4)

各投与群とも、対照群と比べて前肢及び後肢の握力に有意差はみられなかった。

7. 自発運動量

7.1. 雄 (Table 23, Appendix 23-1~23-4)

各投与群とも、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

7.2. 試験群雌 (Table 24, Appendix 24-1~24-4)

各投与群とも、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

8. 尿検査

8.1. 投与期間終了前

8.1.1. 雄 (Table 25-1 及び 25-2, Appendix 25-1~25-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べて尿量の有意な高値及び尿比重の有意な低値がみられた。

180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて尿量及び尿比重に有意差はみられなかった。

各投与群とも、色調、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン及び沈渣は対照群とほぼ同程度であった。

8.1.2. 試験群雌 (Table 26-1 及び 26-2, Appendix 26-1~26-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べて有意差はないものの、尿量の高値傾向がみられた。なお、720 mg/kg 群の 1 例(No. F04452)の尿量は著しく多かった。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて尿量及び尿比重に有意差はみられなかった。

各投与群とも、色調、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン及び沈渣は対照群とほぼ同程度であった。

8.2. 回復期間終了前

8.2.1. 雄 (Table 27-1 及び 27-2, Appendix 27-1~27-4)

各投与群とも、対照群と比べて尿量及び尿比重に有意差はみられなかった。

各投与群とも、色調、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン及び沈渣は対照群とほぼ同程度であった。

8.2.2. 回復群雌 (Table 28-1 及び 28-2, Appendix 28-1~28-3)

各投与群とも、対照群と比べて尿量及び尿比重に有意差はみられなかった。

各投与群とも、色調、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン及び沈渣は対照群とほぼ同程度であった。

ゲン及び沈渣は対照群とほぼ同程度であった。

9. 血液学検査

9.1. 投与期間終了時

9.1.1. 雄 (Table 29, Appendix 29-1~29-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べてプロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間及びフィブリノーゲン濃度の有意な高値がみられた。180 mg/kg 群では、対照群と比べてプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な高値がみられた。45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

9.1.2. 試験群雌 (Table 30, Appendix 30-1~30-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べて赤血球数及びヘマトクリット値の有意な低値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な高値がみられた。その他、720, 180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べてプロトロンビン時間の有意な低値がみられたが、対照群との差はわずかであること、当所の背景データの値(PT:14.0±0.8 sec)に近いことから、投与に基づく変化ではないと判断される。また、180 mg/kg 群では、対照群と比べて白血球数の有意な高値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。

9.2. 回復期間終了時

9.2.1. 雄 (Table 31, Appendix 31-1~31-4)

各投与群とも、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

9.2.2. 回復群雌 (Table 32, Appendix 32-1~32-3)

各投与群とも、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

10. 血液生化学検査

10.1. 投与期間終了時

10.1.1. 雄 (Table 33, Appendix 33-1~33-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べて γ -GTP、総蛋白、アルブミン、A/G、総ビリルビン、総コレステロール及び Ca の有意な高値、Cl の有意な低値がみられた。180 mg/kg 群では、対照群と比べて Ca の有意な高値がみられた。その他、720 mg/kg 群では、対照群と比べて AST の有意な低値がみられたが、対照群の 1 例(No. M01101)が高値であったため生じた変化と判断されることから、毒性学的変化ではないと考えられる。また、180 mg/kg 群では、対照群と比べて K の有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

10.1.2. 試験群雌 (Table 34, Appendix 34-1~34-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べてブドウ糖の有意な低値、 γ -GTP、総蛋白及び総ビリルビン

の有意な高値がみられた。180 mg/kg 群では、対照群と比べて総蛋白の有意な高値がみられた。その他、180 mg/kg 群では、対照群と比べて A/G 及び Cl の有意な低値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与による影響とは考えられない。45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

10.2. 回復期間終了時

10.2.1. 雄 (Table 35, Appendix 35-1～35-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べて γ -GTP の有意な高値がみられた。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

10.2.2. 回復群雌 (Table 36, Appendix 36-1～36-3)

720 mg/kg 群では、対照群と比べて Cl の有意な低値及び総コレステロールの有意な高値がみられたが、当所の背景データの値(Cl:106.2±1.9 mEq/L, T-Chol:74.8±13.3 mg/dL)に近いこと、並びに投与期間終了時にそれらの傾向は認められなかったことから、投与に基づくものではないと判断される。180 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。

11. 剖検

11.1. 死亡例

11.1.1. 試験群雌 (Table 37, Appendix 37)

720 mg/kg 群の死亡例で胸腺及び脾臓の萎縮がみられた。

11.1.2. 回復群雌 (Table 38, Appendix 38)

720 mg/kg 群の死亡例で胸腺の萎縮及び副腎の腫大がみられた。

11.2. 投与期間終了時

11.2.1. 雄 (Table 39, Appendix 39-1～39-4)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

11.2.2. 試験群雌 (Table 40, Appendix 40-1～40-4)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

11.3. 回復期間終了時

11.3.1. 雄 (Table 41, Appendix 41-1～41-4)

45 mg/kg 群では、肝臓の癒着が 1 例にみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、偶発的変化と判断される。720 及び 180 mg/kg 群並びに対照群では、異常はみられなかった。

11.3.2. 回復群雌 (Table 42, Appendix 42-1～42-3)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

12. 器官重量

12.1. 投与期間終了時

12.1.1. 雄 (Table 43, Appendix 43-1~43-4)

剖検日の体重は、720 mg/kg 群では対照群と比べて有意な低値がみられた。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて剖検日の体重に有意差はみられなかった。

器官重量において、720 mg/kg 群では対照群と比べて甲状腺、肝臓及び腎臓の絶対重量及び相対重量の有意な高値、精巣の相対重量の有意な高値、有意差はないものの、精巣の絶対重量の高値傾向がみられた。180 mg/kg 群では、対照群と比べて肝臓及び腎臓の絶対重量及び相対重量の有意な高値がみられた。45 mg/kg 群では、対照群と比べて肝臓の絶対重量及び相対重量の有意な高値がみられた。その他、720 mg/kg 群では、対照群と比べて脳の相対重量の有意な高値がみられたが、絶対重量に有意差が認められることから、対照群との体重差に基づく変化と考えられる。

12.1.2. 試験群雌 (Table 44, Appendix 44-1~44-4)

剖検日の体重は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、720 及び 180 mg/kg 群では対照群と比べて肝臓の絶対重量及び相対重量の有意な高値がみられた。また、720 mg/kg 群では、対照群と比べて甲状腺の相対重量の有意な高値、有意差はないものの、甲状腺の絶対重量の高値傾向がみられた。その他、720 mg/kg 群では、対照群と比べて卵巣の絶対重量の有意な低値がみられたが、相対重量に有意差が認められないことから、投与による影響とは考えられない。45 mg/kg 群では、対照群と比べて各器官の絶対重量及び相対重量に有意差はみられなかった。

12.2. 回復期間終了時

12.2.1. 雄 (Table 45, Appendix 45-1~45-4)

剖検日の体重は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、720 mg/kg 群では対照群と比べて甲状腺の絶対重量及び相対重量の有意な高値、肝臓及び腎臓の相対重量の有意な高値、有意差はないものの、肝臓及び腎臓の絶対重量の高値傾向がみられた。180 mg/kg 群では、対照群と比べて各器官の絶対重量及び相対重量に有意差はみられなかった。その他、45 mg/kg 群では、対照群と比べて甲状腺の絶対重量及び相対重量の有意な高値がみられたが、180 mg/kg 群では有意差が認められること、並びに投与期間終了時にその傾向は認められなかったことから、投与に基づくものではないと判断される。

12.2.2. 回復群雌 (Table 46, Appendix 46-1~46-3)

剖検日の体重は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、720 mg/kg 群では対照群と比べて肝臓及び腎臓の相対重量の有意な高値、有意差はないものの、肝臓及び腎臓の絶対重量の高値傾向がみられた。その他、180 mg/kg 群

では、対照群と比べて下垂体の相対重量の有意な高値がみられたが、720 mg/kg 群では有意差が認められること、並びに投与期間終了時にその傾向は認められなかったことから、投与に基づくものではないと判断される。

13. 病理組織学検査

13.1 死亡例

13.1.1. 720 mg/kg 試験群の雌 (Table 47, Appendix 47)

肝臓：小葉中心性の肝細胞腫大がみられ、その程度は軽度であった。

なお、各組織に死後変化が軽度に認められ、その他の所見は確認できなかった。

13.1.2. 720 mg/kg 回復群の雌 (Table 48, Appendix 48)

肝臓：小葉中心性の肝細胞腫大がみられ、その程度は軽度であった。

なお、各組織に死後変化が軽度に認められ、その他の所見は確認できなかった。

13.2. 投与期間終了時

13.2.1. 雄 (Table 49-1 及び 49-2, Appendix 49-1~49-4)

肝臓：小葉中心性の肝細胞腫大が 720 及び 180 mg/kg 群で 6 例全例と 45 mg/kg 群で 1 例にみられ、その程度は 720 mg/kg 群で軽度又は中等度、180 mg/kg 群でごく軽度又は軽度、45 mg/kg 群でごく軽度であった。肝細胞の好塩基性変化が 720 及び 180 mg/kg 群で 6 例全例と 45 mg/kg 群で 1 例にみられ、その程度は 720 mg/kg 群で軽度、180 及び 45 mg/kg 群でごく軽度であった。小葉中心性の肝細胞腫大及び肝細胞の好塩基性変化は、720 及び 180 mg/kg 群で対照群と比べて有意差が認められ、かつ、用量反応性も確認された。

甲状腺：濾胞上皮のびまん性過形成が 720 mg/kg 群で 6 例全例、180 mg/kg 群で 3 例、45 mg/kg 群で 1 例と対照群で 2 例にみられ、それらの程度は 720 及び 180 mg/kg 群でごく軽度又は軽度、45 mg/kg 群でごく軽度、対照群でごく軽度又は軽度であった。濾胞上皮のびまん性過形成は、720 mg/kg 群では対照群と比べて有意差が認められたことから、720 mg/kg 群の変化は 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン投与による影響と考えられる。

腎臓：尿細管上皮の硝子滴が 720 mg/kg 群で 3 例にみられ、その程度はごく軽度であった。尿細管上皮の硝子滴は、720 mg/kg 群で対照群と比べて有意差が認められ、かつ、用量反応性も確認された。尿細管上皮の変性が 720 及び 180 mg/kg 群で各 1 例にみられたが、それらの程度はいずれもごく軽度であり、対照群と比べて有意差は認められなかった。

その他の変化として以下に示した所見が得られた。

心臓：細胞浸潤が対照群で 2 例にみられた。

肺：血管壁の鉱質沈着が 720 mg/kg 群で 3 例にみられた。

肝臓：限局性的肝細胞壊死が対照群で 1 例にみられた。

空腸：パイエル板の鉱質沈着が 720 mg/kg 群で 2 例と対照群で 1 例にみられた。

前立腺：細胞浸潤が対照群で 3 例にみられた。

なお、これらの変化は対照群でも通常観察される変化であること、それらの程度はいずれも

ごく軽度であること、投与群のそれらの出現頻度は対照群と比べて差がないことから、偶発的変化と判断される。

その他には、720 mg/kg 群及び対照群では、気管、脾臓、舌下腺、顎下腺、食道、胃、十二指腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胸腺、脾臓、下頸リンパ節、腸管膜リンパ節、膀胱、精巣、精巣上体、精嚢、下垂体、副腎、上皮小体、大脳、小脳、延髄、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髄(胸骨・大腿骨)及び骨(胸骨・大腿骨)に異常はみられなかった。

13.2.2. 試験群雌 (Table 50-1 及び 50-2, Appendix 50-1~50-4)

肝臓: 小葉中心性の肝細胞腫大が 720 及び 180 mg/kg 群で 6 例全例にみられ、その程度は 720 mg/kg 群で軽度、180 mg/kg 群でごく軽度であった。肝細胞の好塩基性変化が 720 及び 180 mg/kg 群で 6 例全例にみられ、その程度は 720 及び 180 mg/kg 群ともごく軽度であった。小葉中心性の肝細胞腫大及び肝細胞の好塩基性変化は、720 及び 180 mg/kg 群で対照群と比べて有意差が認められ、かつ、用量反応性も確認された。

腎臓: 集合管上皮の増生及び尿細管の拡張が 720 mg/kg 群で 1 例(尿検査において尿量が著しく多かった No. F04452)にみられ、それらの程度は集合管上皮の増生が軽度、尿細管の拡張がごく軽度であった。

甲状腺: 濾胞上皮のびまん性過形成が 720 mg/kg 群で 3 例、180 mg/kg 群で 1 例と 45 mg/kg 群で 2 例にみられ、それらの程度はいずれもごく軽度であった。濾胞上皮のびまん性過形成は、720 mg/kg 群ではその出現頻度が高いことから、720 mg/kg 群の変化は 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン投与による影響と考えられる。

その他の変化として以下に示した所見が得られた。

脾臓: 骨外造血が 720 mg/kg 群で 4 例と対照群で 3 例にみられた。

なお、この変化は対照群でも通常観察される変化であること、その程度はいずれもごく軽度であること、投与群のその出現頻度は対照群と比べて差がないことから、偶発的変化と判断される。

その他には、720 mg/kg 群及び対照群では、心臓、肺、気管、脾臓、舌下腺、顎下腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胸腺、下頸リンパ節、腸間膜リンパ節、膀胱、卵巣、子宮、腎、下垂体、副腎、上皮小体、大脳、小脳、延髄、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髄(胸骨・大腿骨)、骨(胸骨・大腿骨)及び乳腺に異常はみられなかった。

13.3. 回復期間終了時

13.3.1. 雄 (Table 51, Appendix 51-1~51-4)

肝臓: 小葉中心性の肝細胞腫大が 720 mg/kg 群で 6 例全例と 180 mg/kg 群で 1 例にみられ、それらの程度はいずれもごく軽度であった。小葉中心性の肝細胞腫大は、720 mg/kg 群で対照群と比べて有意差が認められ、かつ、用量反応性も確認された。その他には、癒着が 45 mg/kg 群で 1 例にみられたが、この変化は対照群でも通常観察される変化であること、その程度はごく軽度であること、投与群のその出現頻度は対照群と比べて差がないことから、偶発的変化と判断される。

腎臓：尿細管上皮の変性が 720 mg/kg 群で 1 例にみられ、その程度はごく軽度であった。その他には、尿細管上皮の硝子滴が 180 mg/kg 群及び対照群で各 1 例にみられ、それらの程度はいずれもごく軽度であり、偶発的変化と判断される。

甲状腺：濾胞上皮のびまん性過形成が 720 mg/kg 群で 3 例、180 mg/kg 群で 2 例と 45 mg/kg 群で 1 例にみられ、それらの程度はいずれもごく軽度であった。濾胞上皮のびまん性過形成は、720 mg/kg 群ではその出現頻度が高いことから、720 mg/kg 群の変化は 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン投与による影響と考えられる。その他には、異所性胸腺が 45 mg/kg 群で 1 例にみられたが、この変化は対照群でも通常観察される変化であること、その程度はごく軽度であること、投与群のその出現頻度は対照群と比べて差がないことから、偶発的変化と判断される。

13.3.2. 回復群雌 (Table 52, Appendix 52-1～52-3)

肝臓：小葉中心性の肝細胞腫大が 720 mg/kg 群で 2 例にみられ、その程度はごく軽度であった。

腎臓：囊胞が 180 mg/kg 群で 1 例にみられたが、この変化は対照群でも通常観察される変化であること、その程度はごく軽度であること、投与群のその出現頻度は対照群と比べて差がないことから、偶発的変化と判断される。

甲状腺：720 及び 180 mg/kg 群並びに対照群とも、異常はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物の生殖発生

1.1. 発情回数 (Table 53, Appendix 53-1～53-4)

交配開始前の投与期間(14 日間)の発情回数は、720 mg/kg 群では対照群と比べて有意差はないものの、低値傾向がみられた。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて交配開始前の投与期間(14 日間)の発情回数に有意差はみられなかった。

1.2. 交尾所要日数、交尾率、受胎雌数及び受胎率 (Table 53, Appendix 53-1～53-4)

いずれの群とも全例が交尾した。交尾率は、いずれの群とも 100.0% であった。交尾所要日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

不受胎雌は、720 及び 180 mg/kg 群並びに対照群で各 1 例にみられた。受胎率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

1.3. 妊娠期間 (Table 54, Appendix 54-1～54-4)

妊娠期間は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

1.4. 妊娠黄体数、着床数及び着床率 (Table 54, Appendix 54-1～54-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べて妊娠黄体数及び着床数の有意な低値、有意差はないものの、着床率の低値傾向がみられた。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて妊娠黄体数、着床数及び着床率に有意差はみられなかった。

1.5. 出産率, 分娩状態及び哺育状態 (Table 54 及び 55, Appendix 54-1~54-4 及び 55-1~55-4)

出産率は、いずれの群とも 100.0% であった。

分娩状態において、いずれの群とも異常はみられなかった。

哺育状態において、180 mg/kg 群で巣作り不良及び乳頭発育不良が 1 例(No. F03353)にみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、偶発的変化と判断される。

2. 児動物 (F_1)

2.1. 総出産児数, 死産児数, 哺育 0 日の新生児数, 哺育 0 日の性比, 分娩率, 児の産出率及び出生率 (Table 54, Appendix 54-1~54-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べて総出産児数及び哺育 0 日の新生児数の有意な低値、有意差はないものの、分娩率及び児の産出率の低値傾向がみられた。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて総出産児数、死産児数、哺育 0 日の新生児数、哺育 0 日の性比、分娩率、児の産出率及び出生率に有意差はみられなかった。

2.2. 児動物の一般状態, 哺育 4 日の生存児数, 哺育 4 日の性比, 哺育 4 日の生存率及び外表異常 (Table 54 及び 56, Appendix 54-1~54-4 及び 56-1~56-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べて哺育 4 日の生存児数の有意な低値がみられたが、哺育 4 日の生存率に有意差は認められなかった。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて哺育 4 日の生存児数、哺育 4 日の性比及び哺育 4 日の生存率に有意差はみられなかった。

新生児の外表異常は、いずれの群にもみられなかった。

児動物の一般状態において、180 mg/kg 群の 1 腹(No. F03353:巣作り不良及び乳頭発育不良が認められた母動物)で体温下降がみられたが、偶発的変化と判断される。

2.3. 児動物の体重 (Table 57, Appendix 57-1~57-4)

720 mg/kg 群では、対照群と比べて哺育 0 及び 4 日の雄平均体重の有意な高値、有意差はないものの、哺育 0 及び 4 日の雌平均体重の高値傾向、哺育 0 及び 4 日の一腹平均体重の有意な高値、哺育 0 及び 4 日の一腹合計体重の有意な低値がみられた。180 及び 45 mg/kg 群では、対照群と比べて哺育 0 及び 4 日の雌雄別平均体重、哺育 0 及び 4 日の一腹平均体重、哺育 0 及び 4 日の一腹合計体重に有意差はみられなかった。

2.4. 死亡児の剖検 (Table 58, Appendix 58-1~58-4)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

2.5. 生存児の剖検 (Table 59, Appendix 59-1~59-4)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

考察

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する一般毒性学的影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎及び分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、720 mg/kg を高用量とし、以下 180 及び 45 mg/kg とした。

反復投与による毒性については、死亡例が 720 mg/kg 群で試験群雌 1 例(投与 9 日)と回復群雌 1 例(投与 14 日)に認められた。死亡例では、被毛の汚れ、自発運動の低下、体温下降、鼻周囲の汚れあるいは口周囲の汚れがみられた。死亡例の病理組織学検査では、肝臓に肝細胞腫大がみられたが、軽度な変化であり、重篤な変化ではなかった。その他の器官・組織は死後変化のため、精査できなかつたが、死亡直前に認められた被毛の汚れ、自発運動の低下、体温下降、鼻周囲の汚れあるいは口周囲の汚れから、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンによる全身状態の悪化により死に至つたと考えられる。2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンのラットを用いる単回経口投与毒性試験⁵⁾では、2000 mg/kg 投与により死亡例の発現と下腹部の汚れあるいは下痢がみられている。また、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験の予備試験³⁾でも、1000 mg/kg 投与により死亡例の発現と腹臥位、自発運動の低下、下腹部の被毛の汚れ及び緩徐呼吸がみられている。従つて、当試験で認められた一般状態の変化も2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン投与による影響と考えられる。

一般状態の変化としては、720 mg/kg 群の雌雄の生存例で被毛の汚れがみられた。なお、720 及び 180 mg/kg 群の雌雄で流涎がみられたが、いずれも投与直後に一過性に認められたのみであり、痙攣などの神経症状あるいは唾液腺の形態学的変化は認められないことから、被験物質の刺激性に基づく変化と判断され、毒性症状とはみなさなかつた。

体重は、720 mg/kg 群の雄で投与期間を通して低値、雌で交配開始前に一過性の低値、妊娠 0, 14 及び 21 日に低値がみられた。回復期間には、雄の体重は回復した。摂餌量は、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかつた。

行動機能(FOB)、感覚反応、握力及び自発運動量では、投与に起因する変化はみられなかつた。

尿検査において、投与期間終了時に雄では 720 mg/kg 群で尿量の高値及び尿比重の低値、雌では 720 mg/kg 群で尿量の高値傾向がみられた。回復期間終了時には、雌雄とも投与に起因する変化は認められなかつた。投与期間終了時に雄では 720 及び 180 mg/kg 群で腎臓の絶対重量及び相対重量の高値がみられたが、雌では投与に起因する変化は認められなかつた。回復期間終了時には、雄では 720 mg/kg 群で腎臓の相対重量の高値がみられた。腎臓の病理組織学検査において、投与期間終了時に雄では尿細管上皮の硝子滴及び尿細管上皮の変性、雌では 720 mg/kg 群で集合管上皮の増生及び尿細管の拡張が認められた。尿細管上皮の硝子滴は、ラット雄において多く認められると報告されている⁴⁾。当試験においても、回復期間終了時に対照群の雄 1 例で同程度の尿細管上皮の硝子滴がみられている。720 mg/kg 群では、投与終了時に尿細管上皮の硝子滴が 3 例に認められていることから、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンある

いはその代謝産物により自然発症病変が増悪したと考えられる。また、ごく軽度の尿細管上皮の変性が 720 及び 180 mg/kg 群で各 1 例にみられたが、この変化は対照群では通常観察されないことから、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンあるいはその代謝産物による影響と考えられる。Diphenylthiazole をラットへ投与すると、腎臓の集合管の分裂能が亢進し、囊胞性の病変が認められるが、形態学的変化を生じる前に尿の再吸収能の低下が認められることが報告されている⁶⁾。従って、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンあるいはその代謝産物により尿の再吸収能が低下したと考えられる。しかし、回復期間終了時に 720 mg/kg 群の雄で腎臓の相対重量の高値が認められたのみであり、回復傾向にあると考えられる。

血液学検査において、投与期間終了時に雄では 720 及び 180 mg/kg 群でプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の高値、720 mg/kg 群でフィブリノーゲン濃度の高値、雌では 720 mg/kg 群で活性化部分トロンボプラスチン時間の高値がみられた。回復期間終了時には、雌雄とも投与に起因する変化は認められなかった。また、血液生化学検査において、投与期間終了時に雄では 720 mg/kg 群で γ -GTP、総蛋白、アルブミン、A/G、総ビリルビン、総コレステロール及び Ca の高値並びに Cl の低値、180 mg/kg 群で Ca の高値、雌では 720 及び 180 mg/kg 群で総蛋白の高値、720 mg/kg 群でブドウ糖の低値、 γ -GTP 及び総ビリルビンの高値がみられた。肝臓重量は、投与期間終了時に雄では 720、180 及び 45 mg/kg 群で絶対重量及び相対重量の高値、雌では 720 及び 180 mg/kg 群で絶対重量及び相対重量の高値がみられた。肝臓の病理組織学検査において、投与期間終了時に小葉中心性の肝細胞腫大及び肝細胞の好塩基性変化が雄では 720、180 及び 45 mg/kg 群、雌では 720 及び 180 mg/kg 群でみられた。肝細胞の好塩基性変化は、蛋白合成亢進を示す粗面小胞体の増加や細胞自体に使われる増殖用蛋白の増加を示すリボソームの増加によって細胞質のヘマトキシリントリ染色性が亢進した状態であるとされている⁷⁾。血液生化学検査において、総蛋白、アルブミン及び A/G の高値がみられていることから、肝細胞の好塩基性変化は蛋白合成を亢進する粗面小胞体の増加によると考えられる。また、肝細胞腫大は、蛋白合成亢進及び粗面小胞体を含む細胞内小器官の増加によると考えられる。一方、血液生化学検査において γ -GTP 及び総ビリルビンの高値、血液学検査においてプロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間及びフィブリノーゲン濃度の高値が認められているため、肝細胞腫大に伴う肝機能障害が生じていると考えられる。回復期間終了時には、小葉中心性の肝細胞腫大が雄では 720 及び 180 mg/kg 群、雌では 720 mg/kg 群みられているものの、回復傾向にあると考えられる。

甲状腺重量は、投与期間終了時に 720 mg/kg 群の雌雄で絶対重量及び相対重量の高値あるいは高値傾向がみられた。甲状腺の病理組織学検査において、投与期間終了時に雌雄とも濾胞上皮のびまん性過形成の出現率が 720 mg/kg 群で高かった。従って、720 mg/kg 群の雌雄で認められた甲状腺の重量増加と甲状腺の濾胞上皮のびまん性過形成は、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペント投与による影響と考えられる。通常、活動状態にある濾胞はコロイドに乏しく、濾胞の直径が減少することが報告されている⁸⁾。一方、化学物質の投与により、循環血液中の甲状腺ホルモンが低下し、negative-feedback 機構が関与した持続性の濾胞上皮細胞の刺激が原因となり、濾胞の直径が縮小して、濾胞上皮細胞は立方状あるいは円柱状に腫大化し、濾胞上皮のびまん性過形成を示すことが報告されている⁸⁾。また、甲状腺ホルモンが低下すると、コレステ

ロールの高値が認められることが報告されている⁹⁾。甲状腺機能低下により、コレステロールの胆汁酸への異化の割合が低下し、総コレステロールの高値を示したと考えられる⁹⁾。本試験においても、血液生化学検査において雄で総コレステロールの高値が認められている。従って、本試験で認められた甲状腺の濾胞上皮のびまん性過形成は、甲状腺ホルモンが低下し、そのnegative-feedback 機構に関与したものであると推察される。回復期間終了時には濾胞上皮のびまん性過形成が雄では 720 mg/kg 群で高頻度にみられたが、雌ではいずれの群にも認められていないことから、回復傾向にあると考えられる。

血液学検査において、投与期間終了時に 720 mg/kg 群の雌で認められた赤血球数及びヘマトクリット値の低値は、脾臓及び骨髄に病理組織学変化はみられないものの、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンは造血機能にごく軽度の影響を及ぼす可能性がある。

親動物の生殖発生毒性については、雄では 720 mg/kg 投与で精巣に病理組織学的変化は認められないものの、精巣の相対重量の有意な高値、精巣の絶対重量の高値傾向がみられた。雌では、交配開始前の投与期間(14 日間)の発情回数は 720 mg/kg 群で低値傾向がみられた。720 mg/kg 群では、被毛の汚れ、交配開始前に体重の低値がみられていることから、発情回数の低値傾向は一般状態の悪化に伴う変化と考えられる。また、720 mg/kg 群では、妊娠黄体数、着床数及び着床率の低値あるいは低値傾向がみられた。従って、雄親動物では 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの投与により精巣重量に影響が生じると考えられる。雌親動物では 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの投与により性周期、排卵及び着床に障害が生じると考えられる。しかし、交尾率、交尾所要日数、受胎雌数、受胎率、妊娠期間、出産率、分娩状態及び哺育状態には、投与に起因する変化はみられなかった。

児動物(F₁)については、720 mg/kg群では総出産児数、哺育0日の新生児数、分娩率、児の産出率及び哺育4日の生存児数の低値あるいは低値傾向がみられた。総出産児数、哺育0日の新生児数、分娩率、児の産出率及び哺育4日の生存児数の低値あるいは低値傾向は、妊娠黄体数、着床数及び着床率の低値あるいは低値傾向に伴う変化と考えられる。また、720 mg/kg群では、哺育0及び4日の雌雄平均体重及び一腹平均体重の高値あるいは高値傾向、哺育0及び4日の一腹合計体重の低値がみられた。哺育0及び4日の雌雄平均体重及び一腹平均体重の高値あるいは高値傾向、哺育0及び4日の一腹合計体重の低値は、生存児数の減少に伴う変化と考えられる。一般状態、外表及び剖検において、投与に起因する変化はみられなかった。

以上のように、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの無影響量は、雄では 45 mg/kg 投与で肝臓の絶対重量及び相対重量の高値並びに小葉中心性の肝細胞腫大及び肝細胞の好塩基性変化が認められたことから 45 mg/kg/day 未満、雌では 180 mg/kg 投与で肝臓の絶対重量及び相対重量の高値並びに小葉中心性の肝細胞腫大及び肝細胞の好塩基性変化が認められたことから 45 mg/kg/day と考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雄では 720 mg/kg 投与で精巣重量に影響が認められたことから 180 mg/kg/day、雌では 720 mg/kg 投与で性周期、妊娠黄体数、着床数及び着床率に影響が認められたことから 180 mg/kg/day と考えられる。児動物への無影響量は、720 mg/kg 投与で総出産児数、哺育 0 日の新生児数、分娩率、児の産出率及び哺育 4 日の生存児数、雌雄体重に影響が認められたことから 180 mg/kg/day と考えられる。

Table 1-1 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post				
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
1,1'-(1,1-dimethyl- 3-methylene-1,3- propanediyl) bisbenzene	45	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	180	Number of males Normal Salivation	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	720	Number of males Normal Salivation Soiled hair	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-2 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	45	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	180	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	4	12	6	12	8	12	6	12	8	12	9	12	5	12	8	12	9	12	9	12	8	12	9	12	7
		Salivation	0	8	0	6	0	4	0	6	0	4	0	3	0	7	0	4	0	3	0	3	0	4	0	3	0	5
	720	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	1	12	0	12	0	12	1	12	0	12	0	12	1	12	3	12	0	12	0	12	2	12	2	12	0
		Salivation	0	11	0	12	0	12	0	11	0	12	0	12	0	11	0	9	0	12	0	12	0	10	0	10	0	12
		Soiled hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-3 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	45	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
	180	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
		Normal	12	7	12	8	12	9	12	9	12	5	12	4	12	7	12	7	12	9	12	9	12	10	12	7		
		Salivation	0	5	0	4	0	3	0	3	0	7	0	8	0	5	0	5	0	3	0	3	0	2	0	5		
720	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
		Normal	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0		
		Salivation	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12		
		Soiled hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-4 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration				Total ^{a)}	
			40		41			
			Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of males	12	12	12	12	6	12
		Normal	12	12	12	12	12	-
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	45	Number of males	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	-
	180	Number of males	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	11	12	2	12	-
		Salivation	0	1	0	10	0	12
	720	Number of males	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	4	12	0	12	-
		Salivation	0	8	0	12	0	12
		Soiled hair	0	0	0	0	0	1

Pre: Before administration, Post: after administration.

a): Number of males showing abnormal signs at least once between Days 1 and 43 of administration.

Table 1-5 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of recovery														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Control	0	Number of males	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	45	Number of males	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	180	Number of males	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	720	Number of males	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Table 2-1 General signs of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																						
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	
Control	0	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	45	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	180	Number of females Normal Salivation	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	720	Number of females Normal Salivation Soiled hair Hypothermia Decrease in locomotor activity Death	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11
			12	12	12	11	12	5	11	7	9	8	10	6	10	3	9	2	10	5	10	6	11	4	11
			0	0	0	1	0	7	0	5	0	3	0	6	0	9	0	9	0	6	0	5	0	7	0
			0	0	0	0	0	0	1	1	3	2	2	2	2	3	3	1	1	1	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 2-2 General signs of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																								Total ^{a)}	
			15*		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26			
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of females Normal	12	12	10	10	8	8	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	
			12	12	10	10	8	8	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	45	Number of females Normal	12	12	8	8	5	5	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	
			12	12	8	8	5	5	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	180	Number of females Normal Salivation	12	12	9	9	4	4	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	12	
			12	0	9	6	4	2	3	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0		
	720	Number of females Normal Salivation Soiled hair Hypothermia Decrease in locomotor activity Death	11	11	7	7	5	5	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	
			11	0	7	0	5	0	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			0	11	0	7	0	5	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12		
			0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4		
			0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		
			0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		
			0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		

Pre: Before administration, Post: after administration.

*: Start of pairing.

a): Number of females showing abnormal signs at least once between Days 1 and 27 of administration.

Table 3-1 General signs of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of pregnancy																														
			0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post			
Control	0	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11			
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11			
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	45	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			
	180	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11		
		Normal	11	3	11	8	11	6	11	6	11	7	11	6	11	6	11	6	11	7	11	6	11	7	11	6	11	7	11	6	11		
		Salivation	0	8	0	3	0	5	0	5	0	4	0	5	0	5	0	5	0	4	0	5	0	4	0	5	0	4	0	5	0	4	
	720	Number of dams	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		Normal	9	1	10	2	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	2	10	0	10	0	10	0	10	0	10		
		Salivation	0	9	0	8	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	8	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	
		Soiled hair	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 3-2 General signs of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of pregnancy												Total ^{a)}								
			15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post			
Control	0	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	1	1	0	0	0	0	11	
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	1	1	-	-	-	-	-	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	45	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	2	2	0	0	0	0	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	2	2	-	-	-	-	-
	180	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	0	0	0	0	0	0	11
		Normal	11	10	11	10	11	10	11	8	11	8	11	9	11	9	-	-	-	-	-	-	-
		Salivation	0	1	0	1	0	1	0	3	0	3	0	2	0	2	-	-	-	-	-	-	9
	720	Number of dams	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	5	0	0	0	0	10
		Normal	10	0	10	0	10	1	10	0	10	0	10	1	10	2	5	0	-	-	-	-	-
		Salivation	0	10	0	10	0	9	0	10	0	10	0	9	0	8	0	5	-	-	-	-	10
		Soiled hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	1

Pre: Before administration, Post: after administration.

a): Number of dams showing abnormal signs at least once between Days 0 and 25 of pregnancy.

Table 4 General signs of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of lactation														Total ^{a)}	
			0		1		2		3		4		5		6			
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
		Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	-	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	45	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	-	
	180	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	10	10	10	10	11	
		Normal	11	10	11	8	11	10	11	8	11	7	10	9	10	10	-	
		Salivation	0	1	0	3	0	1	0	3	0	3	0	1	0	0	4	
720	Number of dams	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10		
	Normal	10	0	10	0	9	1	9	0	9	2	9	2	9	0	9		
	Salivation	0	10	0	9	0	8	0	9	0	7	0	7	0	9	0		

Pre: Before administration, Post: after administration.

a): Number of dams showing abnormal signs at least once between Days 0 and 7 of lactation.

Table 5-1 General signs of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																									
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	180	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	4	6	3	6	4	6	
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	2	0	3	0	2	0	4
	720	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Normal	6	6	6	3	6	4	6	5	6	3	6	0	6	2	6	0	6	0	6	0	5	1	5	0	5	0
		Salivation	0	0	0	2	0	2	0	0	0	3	0	6	0	4	0	6	0	6	0	6	0	5	0	5	0	5
		Soiled hair	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
		Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
		Soiled perinasal area	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
		Perioral smudge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
		Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 5-2 General signs of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																									
			14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6		
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6		
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	180	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6		
		Normal	6	3	6	3	6	5	6	4	6	4	6	4	6	2	6	2	6	4	6	4	6	4	6	1		
		Salivation	0	3	0	3	0	1	0	2	0	2	0	2	0	4	0	4	0	2	0	2	0	2	0	5		
	720	Number of females	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		Normal	5	0	5	0	5	1	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0		
		Salivation	0	5	0	5	0	4	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5		
		Soiled hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Soiled perinasal area	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Perioral smudge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Death	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 5-3 General signs of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																									
			27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	180	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		Normal	6	4	6	4	6	2	6	1	6	2	6	3	6	3	6	1	6	3	6	6	6	6	6	6	6	
		Salivation	0	2	0	2	0	4	0	5	0	4	0	3	0	3	0	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	
	720	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Normal	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	
		Salivation	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	
		Soiled hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Soiled perinasal area	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Perioral smudge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 5-4 General signs of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration						Total ^{a)}	
			40		41		42			
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	
		Normal	6	6	6	6	6	6	-	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	180	Number of females	6	6	6	6	6	6	6	
		Normal	6	5	6	3	6	6	-	
		Salivation	0	1	0	3	0	0	5	
	720	Number of females	5	5	5	5	5	5	6	
		Normal	5	0	5	0	5	0	-	
		Salivation	0	5	0	5	0	5	6	
		Soiled hair	0	0	0	0	0	0	2	
		Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	1	
		Soiled perinasal area	0	0	0	0	0	0	1	
		Perioral smudge	0	0	0	0	0	0	1	
		Death	0	0	0	0	0	0	1	

Pre: Before administration, Post: after administration.

a): Number of females showing abnormal signs at least once between Days 1 and 42 of administration.

**Table 5-5 General signs of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration**

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of recovery													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	0	Number of females Normal	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	180	Number of females Normal	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6
	720	Number of females Normal	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5

Table 6 Body weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
mg/kg	0	45	180	720	
Number of males	12		12		12
Days of administration					
1	396 ± 14	396 ± 14	395 ± 14	396 ± 14	
4	407 ± 14	404 ± 15	398 ± 14	388 ± 12 **	
8	422 ± 13	422 ± 18	416 ± 16	401 ± 13 **	
11	435 ± 16	434 ± 20	429 ± 19	412 ± 15 **	
15	447 ± 16	448 ± 21	442 ± 21	422 ± 18 **	
18	454 ± 18	456 ± 25	449 ± 22	426 ± 20 **	
22	463 ± 21	468 ± 27	457 ± 23	435 ± 22 *	
25	473 ± 22	477 ± 27	466 ± 24	444 ± 22 *	
29	485 ± 23	487 ± 29	474 ± 24	449 ± 25 **	
32	493 ± 25	499 ± 30	483 ± 24	455 ± 30 **	
36	506 ± 26	508 ± 31	492 ± 22	465 ± 30 **	
39	510 ± 27	513 ± 32	499 ± 23	471 ± 30 **	
42	516 ± 26	523 ± 35	505 ± 24	477 ± 35 **	
Number of males	6	6	6	6	
Days of recovery					
1	515 ± 15	524 ± 28	513 ± 23	475 ± 44	
4	521 ± 15	530 ± 26	519 ± 25	476 ± 44 *	
8	532 ± 14	541 ± 29	531 ± 29	493 ± 47	
11	533 ± 14	544 ± 26	537 ± 29	496 ± 45	
14	541 ± 15	550 ± 26	547 ± 32	511 ± 44	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 7 Body weights of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of females	12	12	12	12	
Days of administration					
1	232 ± 8	231 ± 8	232 ± 8	232 ± 8	
4	235 ± 8	234 ± 9	234 ± 10	225 ± 12 *	
8	243 ± 7	240 ± 10	241 ± 9	232 ± 23	
11	248 ± 8	248 ± 11	246 ± 11	246 ± 7 (11)	
15	259 ± 7	255 ± 12	254 ± 12	252 ± 8 (11)	
18	267 ± 13 (3)	260 ± 14 (4)	250 ± 13 (3)	260 ± 9 (3)	
22	-	-	275 (2)	-	
25	-	-	287 (2)	-	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Figures in parentheses indicate number of females.

Table 8 Body weights of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of dams	11		12		11
Days of pregnancy					10
0	265 ± 11	258 ± 13	261 ± 17	249 ± 10 *	
7	294 ± 14	288 ± 15	285 ± 20	278 ± 9	
14	326 ± 17	320 ± 17	314 ± 18	306 ± 12 *	
21	417 ± 27	412 ± 16 (11)	409 ± 31	362 ± 30 **	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Figures in parentheses indicate number of dams.

Table 9 Body weights of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	mg/kg	0	45	180	720
Number of dams		11	12	11	10
Days of lactation					
0	306 ± 20	304 ± 15	298 ± 16	291 ± 13	
4	314 ± 19	317 ± 15	300 ± 19	300 ± 15	(9)
6	297 ± 23	301 ± 18	297 ± 15 (10)	294 ± 15	(9)

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Table 10 Body weights of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
mg/kg	0	180	720
Number of females	6	6	6
Days of administration			
1	236 ± 7	235 ± 8	236 ± 6
4	241 ± 7	240 ± 7	240 ± 7
8	247 ± 7	245 ± 7	249 ± 9
11	253 ± 10	252 ± 8	244 ± 29
15	258 ± 12	260 ± 8	259 ± 5 (5)
18	265 ± 9	260 ± 12	267 ± 6 (5)
22	273 ± 8	266 ± 8	271 ± 8 (5)
25	277 ± 8	269 ± 6	276 ± 10 (5)
29	282 ± 9	272 ± 7	277 ± 6 (5)
32	284 ± 12	273 ± 5	279 ± 6 (5)
36	288 ± 11	274 ± 3 *	283 ± 10 (5)
39	289 ± 15	275 ± 5	284 ± 9 (5)
42	292 ± 15	277 ± 5	290 ± 12 (5)
Number of females	6	6	5
Days of recovery			
1	291 ± 16	275 ± 4	291 ± 11
4	295 ± 14	280 ± 4 *	286 ± 13
8	300 ± 13	286 ± 6	288 ± 17
11	300 ± 13	287 ± 12	288 ± 18
14	307 ± 15	291 ± 15	294 ± 15

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 11 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
mg/kg	0	45	180	720	
Number of males	12	12	12	12	
Days of administration					
2	23 ± 3	24 ± 5	23 ± 4	22 ± 5	
5	25 ± 2	24 ± 4	24 ± 4	23 ± 3	
9	26 ± 3	25 ± 3	25 ± 4	23 ± 2	
12	25 ± 2	25 ± 4	24 ± 3	25 ± 2	
30	23 ± 3	22 ± 3	21 ± 2	25 ± 3	
33	22 ± 4	22 ± 3	23 ± 2	26 ± 3 **	
37	24 ± 4	24 ± 3	23 ± 2	29 ± 4 **	
40	20 ± 2	20 ± 3	19 ± 2	25 ± 5 **	
Number of males	6	6	6	6	
Days of recovery					
2	24 ± 2	24 ± 2	26 ± 3	30 ± 5 *	
5	28 ± 2	28 ± 3	29 ± 3	32 ± 4	
9	28 ± 3	29 ± 3	31 ± 2	32 ± 4	
12	28 ± 1	27 ± 2	30 ± 3	33 ± 4 *	

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 12 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of females	12	12	12	12	
Days of administration					
2	13 ± 3	13 ± 2	13 ± 2	14 ± 4	
5	16 ± 2	16 ± 3	16 ± 3	14 ± 4	
9	14 ± 3	13 ± 2	13 ± 2	13 ± 3	(11)
12	18 ± 2	16 ± 2	16 ± 3	16 ± 3	(11)

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

Table 13 Food consumption of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
mg/kg	0	45	180	720
Number of dams	11	12	11	10
Days of pregnancy				
2	17 ± 3	17 ± 3	16 ± 3	20 ± 3 *
9	19 ± 3	17 ± 3	18 ± 3	21 ± 2
16	21 ± 4	21 ± 2	21 ± 3	21 ± 2
20	21 ± 5	21 ± 3	22 ± 5	24 ± 3

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 14 Food consumption of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
mg/kg	0	45	180	720
Number of dams	11	12	11	9
Days of lactation	2	21 ± 7	23 ± 5	22 ± 3
				22 ± 7

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 15 Food consumption of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
mg/kg	0	180	720
Number of females	6	6	6
Days of administration			
2	15 ± 2	15 ± 3	15 ± 3
5	16 ± 2	14 ± 2	14 ± 3
9	15 ± 1	12 ± 2 *	17 ± 2
12	16 ± 2	17 ± 2	14 ± 6
16	14 ± 2	15 ± 2	16 ± 2 (5)
19	13 ± 2	14 ± 2	17 ± 1 * (5)
23	13 ± 2	12 ± 3	18 ± 1 ** (5)
26	17 ± 2	18 ± 2	21 ± 2 * (5)
30	15 ± 2	16 ± 3	19 ± 4 (5)
33	14 ± 2	17 ± 3	17 ± 2 (5)
37	15 ± 1	19 ± 9	19 ± 3 (5)
40	14 ± 2	18 ± 5	18 ± 2 (5)
Number of females	6	6	5
Days of recovery			
2	16 ± 1	18 ± 4	20 ± 3
5	18 ± 2	20 ± 6	20 ± 3
9	21 ± 4	19 ± 5	21 ± 3
12	20 ± 3	19 ± 2	21 ± 3

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Figures in parentheses indicate number of females.

Table 16-1 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of males	12	12	12	12	
Observation of animals in cages					
Posture	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 7	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 14	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 21	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 28	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 35	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 41	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Palpebral closure	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Biting behavior	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Clonic convulsions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Posture 1: Prone or recumbent position, 2: resting normally, 3: moving or running about, 4: jumping.

Palpebral closure 1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Biting behavior 1: Not observed, 2: observed.

Clonic convulsions 1: Not observed, 2: jaw convulsions, 3: tremor.

Table 16-2 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
		45	180	720
Number of males	12	12	12	12
Observation of animals in cages				
Tonic convulsions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Tonic convulsions

1: Not observed, 2: tonic extension, 3: opisthotonus convulsions, 4: saltatory convulsions, 5: asphyxial convulsions.

Table 16-3 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of males	12	12	12	12	
Observation of animals on observer's palm					
Ease of removal from cage	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 7	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 14	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 21	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 28	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 35	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 41	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Ease of handling	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 7	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 14	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 21	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 28	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 35	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 41	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Muscle tone	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 7	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 14	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 21	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 28	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 35	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 41	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Fur conditions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Ease of removal from cage

1: Docile and allowing itself to be handled, 2: rearing or cowering, 3: running about; hard to catch.

Ease of handling

1: Docile and allowing itself to be handled, 2: struggling slightly or vocalizing, 3: struggling and trying to bite observer's hand.

Muscle tone

1: Decreased, 2: normal, 3: increased.

Fur conditions

1: Normal, 2: slightly soiled, 3: markedly soiled.

Table 16-4 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
		45	180	720
Number of males	12	12	12	12
Observation of animals on observer's palm				
Lacrimation	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Salivation	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.7 (1-2) **
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	2.1 (1-3) **
	Day 21	1.0 (1)	1.3 (1-2) *	1.8 (1-2) **
	Day 28	1.0 (1)	1.2 (1-2)	1.8 (1-2) **
	Day 35	1.0 (1)	1.2 (1-2)	2.0 (2) **
	Day 41	1.0 (1)	1.3 (1-2) *	1.9 (1-2) **
Respiration	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Findings were graded as follows

Lacrimation 1: None, 2: mild, 3: marked.

Salivation 1: None, 2: mild, 3: marked.

Respiration 1: Normal, 2: bradypnea, 3: dyspnea.

Table 16-5 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
	0	12	45	12	180	12
Number of males	12	12	12	12	12	12
Open-field test						
Frequency of rearing Mean ± S.D.	Pre	5.2 ± 3.7	3.3 ± 2.8	4.5 ± 4.7	4.6 ± 3.1	
	Day 7	11.4 ± 4.1	7.0 ± 5.2	9.3 ± 4.5	6.7 ± 4.2 *	
	Day 14	3.6 ± 2.4	3.1 ± 2.4	3.3 ± 3.3	4.3 ± 3.9	
	Day 21	2.7 ± 2.9	2.8 ± 2.7	2.5 ± 2.2	2.8 ± 4.2	
	Day 28	4.8 ± 2.2	3.9 ± 3.9	2.8 ± 2.6	3.0 ± 2.9	
	Day 35	7.3 ± 4.0	4.9 ± 3.4	7.2 ± 3.1	4.6 ± 3.3	
	Day 41	4.9 ± 2.5	5.0 ± 4.4	3.1 ± 2.8	4.5 ± 3.1	
Frequency of grooming Mean ± S.D.	Pre	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 14	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 21	0.2 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 28	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 35	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 41	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Gait Mean (range)	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
Palpebral closure Mean (range)	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Frequency of rearing (during a 2-minute period).

Frequency of grooming (during a 2-minute period).

Findings were graded as follows

Gait

1: Normal, 2: unmoving, 3: staggering, 4: hind-limbs extended and dragged, 5: all fours extended,

6: forelimbs extended and dragged; unable to support body, 7: standing on tiptoe.

Palpebral closure

1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Table 16-6 FOB of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
		0	45	180	720
Number of males	12	12	12	12	12
Open-field test					
Consciousness Mean (range)	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 7	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 14	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 21	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 28	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 35	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 41	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Behavioral abnormalities Mean (range)	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Righting reflex Mean (range)	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 7	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 14	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 21	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 28	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 35	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 41	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)

Findings were graded as follows

Consciousness 1: Comatose; no response, 2: exploring behavior, 3: excited and moving spasmodically.

Behavioral abnormalities 1: Not observed, 2: straub's reaction, 3: moving backward, 4: writhing.

Righting reflex 1: Righting itself immediately, 2: requiring 3 seconds or longer to right itself, 3: unable to right itself.

Table 17-1 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
		45	180	720	
Number of females	12	12	12	12	
Observation of animals in cages					
Posture Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [10] 2.0 (2) [10] 2.0 (2) [10] 2.0 (2) [9]
Palpebral closure Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [9]
Biting behavior Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [9]
Clonic convulsions Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [9]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Posture 1: Prone or recumbent position, 2: resting normally, 3: moving or running about, 4: jumping.

Palpebral closure 1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Biting behavior 1: Not observed, 2: observed.

Clonic convulsions 1: Not observed, 2: jaw convulsions, 3: tremor.

Table 17-2 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
mg/kg	0	45	180	720	
Number of females	12	12	12	12	
Observation of animals in cages					
Tonic convulsions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [11]	1.0 (1) [10]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [11]	1.0 (1) [10]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [11]	1.0 (1) [10]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [11]	1.0 (1) [9]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Tonic convulsions

1: Not observed, 2: tonic extension, 3: opisthotonus convulsions, 4: saltatory convulsions, 5: asphyxial convulsions.

Table 17-3 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
Number of females	0	45	180	720	
Observation of animals on observer's palm					
Ease of removal from cage Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]	2.0 (2) 1.9 (1-2) 2.0 (2) 2.0 (2) [10] 2.0 (2) 2.0 (2) [10] 2.0 (2) [9]
Ease of handling Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 1.9 (1-2) 2.0 (2) 2.0 (2) [10] 2.0 (2) 2.0 (2) [10] 2.0 (2) [9]	
Muscle tone Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11] 2.0 (2) [11]	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 1.9 (1-2) 2.0 (2) 2.0 (2) [10] 2.0 (2) 2.0 (2) [10] 2.0 (2) [9]	
Fur conditions Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.3 (1-3) * 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [9]	

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Findings were graded as follows

Ease of removal from cage 1: Docile and allowing itself to be handled, 2: rearing or cowering, 3: running about; hard to catch.

Ease of handling 1: Docile and allowing itself to be handled, 2: struggling slightly or vocalizing, 3: struggling and trying to bite observer's hand.

Muscle tone 1: Decreased, 2: normal, 3: increased.

Fur conditions 1: Normal, 2: slightly soiled, 3: markedly soiled.

Table 17-4 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
		45	180	720	
Number of females	12	12	12	12	
Observation of animals on observer's palm					
Lacrimation Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [9]
Salivation Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.2 (1-2) 1.1 (1-2) [11] 1.3 (1-2) [11] 1.1 (1-2) [11] 1.2 (1-2) [11]	1.0 (1) 1.7 (1-2) ** [11] 1.9 (1-2) ** [11] 1.7 (1-3) ** [10] 1.7 (1-2) ** [10] 1.8 (1-2) ** [10] 2.0 (2) ** [9]
Respiration Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 1 of pregnancy Day 8 of pregnancy Day 15 of pregnancy Day 3 of lactation	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11] 1.0 (1) [11]	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [10] 1.0 (1) [9]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Significantly different from control group (**: P<0.01).

Findings were graded as follows

Lacrimation 1: None, 2: mild, 3: marked.

Salivation 1: None, 2: mild, 3: marked.

Respiration 1: Normal, 2: bradypnea, 3: dyspnea.

Table 17-5 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
	0	45	180	720		
Number of females	12	12	12	12		
Open-field test						
Frequency of rearing	Pre	7.6 ± 4.6	8.8 ± 4.7	10.3 ± 6.0	7.6 ± 3.9	
Mean ± S.D.	Day 8	9.3 ± 4.7	10.7 ± 4.0	9.2 ± 5.4	7.0 ± 3.2	
	Day 15	8.3 ± 4.1	10.4 ± 5.6	11.2 ± 5.4	7.6 ± 3.6	[11]
	Day 1 of pregnancy	4.5 ± 3.9	[11]	6.8 ± 4.0	5.7 ± 2.4	[11]
	Day 8 of pregnancy	6.5 ± 3.4	[11]	9.0 ± 4.4	8.6 ± 3.0	[11]
	Day 15 of pregnancy	8.2 ± 4.3	[11]	10.3 ± 3.5	7.1 ± 3.4	[11]
	Day 3 of lactation	9.6 ± 6.4	[11]	11.0 ± 6.2	7.3 ± 4.0	[11]
Frequency of grooming	Pre	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Mean ± S.D.	Day 8	0.2 ± 0.6	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	
	Day 15	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 1 of pregnancy	0.0 ± 0.0	[11]	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	[11]
	Day 8 of pregnancy	0.0 ± 0.0	[11]	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	[11]
	Day 15 of pregnancy	0.3 ± 0.9	[11]	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	[11]
	Day 3 of lactation	0.4 ± 0.7	[11]	0.0 ± 0.0 *	0.0 ± 0.0 *	[11]
Gait	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1)	[11]	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1)	[11]	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1)	[11]	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1)	[11]	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
Palpebral closure	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1)	[11]	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1)	[11]	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1)	[11]	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]
	Day 3 of lactation	1.0 (1)	[11]	1.0 (1)	1.0 (1)	[11]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Frequency of rearing (during a 2-minute period).

Frequency of grooming (during a 2-minute period).

Findings were graded as follows

Gait

1: Normal, 2: unmoving, 3: staggering, 4: hind-limbs extended and dragged, 5: all fours extended,
6: forelimbs extended and dragged; unable to support body, 7: standing on tiptoe.

Palpebral closure

1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Table 17-6 FOB of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
		45	180	720
Number of females	12	12	12	12
Open-field test				
Consciousness	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 8	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 15	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 1 of pregnancy	2.0 (2) [11]	2.0 (2)	2.0 (2) [11]
	Day 8 of pregnancy	2.0 (2) [11]	2.0 (2)	2.0 (2) [10]
	Day 15 of pregnancy	2.0 (2) [11]	2.0 (2)	2.0 (2) [10]
	Day 3 of lactation	2.0 (2) [11]	2.0 (2)	2.0 (2) [9]
Behavioral abnormalities	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [10]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [10]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [10]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [9]
Righting reflex	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [11]
	Day 1 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [10]
	Day 8 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [10]
	Day 15 of pregnancy	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [10]
	Day 3 of lactation	1.0 (1) [11]	1.0 (1)	1.0 (1) [9]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Consciousness

1: Comatose; no response, 2: exploring behavior, 3: excited and moving spasmodically.

Behavioral abnormalities

1: Not observed, 2: straub's reaction, 3: moving backward, 4: writhing.

Righting reflex

1: Righting itself immediately, 2: requiring 3 seconds or longer to right itself, 3: unable to right itself.

Table 18-1 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
		180	720
Number of females	6	6	6
Observation of animals in cages			
Posture	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 8	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 15	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 22	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 29	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 36	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 42	2.0 (2)	2.0 (2)
Palpebral closure	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)
Biting behavior	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)
Clonic convulsions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Posture 1: Prone or recumbent position, 2: resting normally, 3: moving or running about, 4: jumping.

Palpebral closure 1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Biting behavior 1: Not observed, 2: observed.

Clonic convulsions 1: Not observed, 2: jaw convulsions, 3: tremor.

Table 18-2 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
mg/kg	0	180	720
Number of females	6	6	6
Observation of animals in cages			
Tonic convulsions	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Tonic convulsions

1: Not observed, 2: tonic extension, 3: opisthotonus convulsions, 4: saltatory convulsions, 5: asphyxial convulsions.

Table 18-3 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control 0	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene 180	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene 720	
Number of females	6	6	6	
Observation of animals on observer's palm				
Ease of removal from cage Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 22 Day 29 Day 36 Day 42	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)
Ease of handling Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 22 Day 29 Day 36 Day 42	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)
Muscle tone Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 22 Day 29 Day 36 Day 42	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)	2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2) 2.0 (2)
Fur conditions Mean (range)	Pre Day 8 Day 15 Day 22 Day 29 Day 36 Day 42	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)	1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1) 1.0 (1)

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Ease of removal from cage

1: Docile and allowing itself to be handled, 2: rearing or cowering, 3: running about; hard to catch.

Ease of handling

1: Docile and allowing itself to be handled, 2: struggling slightly or vocalizing, 3: struggling and trying to bite observer's hand.

Muscle tone

1: Decreased, 2: normal, 3: increased.

Fur conditions

1: Normal, 2: slightly soiled, 3: markedly soiled.

Table 18-4 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group		Control	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
mg/kg		0	180	720
Number of females		6	6	6
Observation of animals on observer's palm				
Lacrimation	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
Salivation	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.8 (1-2) **
	Day 15	1.0 (1)	1.3 (1-2)	2.0 (2) ** [5]
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	2.0 (2) [5]
	Day 29	1.0 (1)	1.7 (1-2) **	2.0 (2) ** [5]
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.8 (1-2) ** [5]
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	2.0 (2) [5]
Respiration	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Significantly different from control group (**: P<0.01).

Findings were graded as follows

Lacrimation

1: None, 2: mild, 3: marked.

Salivation

1: None, 2: mild, 3: marked.

Respiration

1: Normal, 2: bradypnea, 3: dyspnea.

Table 18-5 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		6
	0	180	720		
Number of females	6	6	6		
Open-field test					
Frequency of rearing Mean ± S.D.	Pre	4.7 ± 2.9	5.8 ± 4.3	6.5 ± 2.3	
	Day 8	6.8 ± 4.4	6.0 ± 2.2	5.7 ± 1.5	
	Day 15	8.0 ± 3.5	6.7 ± 3.0	10.4 ± 3.2 [5]	
	Day 22	3.8 ± 1.0	4.3 ± 1.6	3.0 ± 1.0 [5]	
	Day 29	7.8 ± 3.9	4.7 ± 1.8	9.4 ± 3.6 [5]	
	Day 36	8.3 ± 1.4	7.8 ± 3.7	7.6 ± 5.7 [5]	
	Day 42	4.8 ± 2.6	6.0 ± 3.8	7.0 ± 4.9 [5]	
Frequency of grooming Mean ± S.D.	Pre	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
	Day 15	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 [5]	
	Day 22	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 [5]	
	Day 29	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 [5]	
	Day 36	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 [5]	
	Day 42	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 [5]	
Gait Mean (range)	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]	
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]	
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]	
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]	
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]	
Palpebral closure Mean (range)	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]	
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]	
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]	
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]	
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]	

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Frequency of rearing (during a 2-minute period).

Frequency of grooming (during a 2-minute period).

Findings were graded as follows

Gait 1: Normal, 2: unmoving, 3: staggering, 4: hind-limbs extended and dragged, 5: all fours extended,
6: forelimbs extended and dragged; unable to support body, 7: standing on tiptoe.

Palpebral closure 1: Eyelids open normally, 2: eyelids half-closed, 3: eyelids closed.

Table 18-6 FOB of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group		Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
mg/kg		0	180	720
Number of females		6	6	6
Open-field test				
Consciousness	Pre	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Mean (range)	Day 8	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
	Day 15	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2) [5]
	Day 22	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2) [5]
	Day 29	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2) [5]
	Day 36	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2) [5]
	Day 42	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2) [5]
Behavioral abnormalities	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
Righting reflex	Pre	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Mean (range)	Day 8	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
	Day 15	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 22	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 29	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 36	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]
	Day 42	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1) [5]

Figures in parentheses [] indicate number of females.

Findings were graded as follows

Consciousness 1: Comatose; no response, 2: exploring behavior, 3: excited and moving spasmodically.

Behavioral abnormalities 1: Not observed, 2: straub's reaction, 3: moving backward, 4: writhing.

Righting reflex 1: Righting itself immediately, 2: requiring 3 seconds or longer to right itself, 3: unable to right itself.

Table 19 Sensory response of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	mg/kg	0	45	180	720
Number of males	6	6	6	6	
Pupillary reflex					
Mean (range)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
Approaching behavior					
Mean (range)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	
Response to touch					
Mean (range)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	
Auditory reflex					
Mean (range)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	
Pain reflex					
Mean (range)	3.0 (3)	3.0 (3)	3.0 (3)	3.0 (3)	

Findings were graded as follows.

Pupillary reflex

1: Normal pupillary contraction observed, 2: pupils completely dilated, 3: pupils completely contracted.

Approaching behavior

1: Not observed, 2: approaching and sniffing stimulus, 3: reacting to stimulus, including vocalizing,
4: jumping at or biting at stimulus.

Response to touch

1: No response, 2: looking back and leaving stimulus, 3: reacting to stimulus, including vocalizing,
4: jumping at or biting at stimulus.

Auditory reflex

1: Not observed, 2: hesitating at stimulus or moving ears, 3: jumping at and trying to bite at the source of sound.

Pain reflex

1: Not observed, 2: slowly looking back or slowly moving forward to escape from stimulus,

3: quickly moving forward to escape from stimulus or biting at it immediately after looking back,

4: jumping forward to escape from stimulus, 5: loudly vocalizing and biting at stimulus after suddenly looking back.

Table 20 Sensory response of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of females	6	6	6	6	
Pupillary reflex					
Mean (range)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
Approaching behavior					
Mean (range)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	
Response to touch					
Mean (range)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	
Auditory reflex					
Mean (range)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	
Pain reflex					
Mean (range)	3.0 (3)	3.0 (3)	3.0 (3)	3.0 (3)	

Findings were graded as follows.

Pupillary reflex

1: Normal pupillary contraction observed, 2: pupils completely dilated, 3: pupils completely contracted.

Approaching behavior

1: Not observed, 2: approaching and sniffing stimulus, 3: reacting to stimulus, including vocalizing,
4: jumping at or biting at stimulus.

Response to touch

1: No response, 2: looking back and leaving stimulus, 3: reacting to stimulus, including vocalizing,
4: jumping at or biting at stimulus.

Auditory reflex

1: Not observed, 2: hesitating at stimulus or moving ears, 3: jumping at and trying to bite at the source of sound.

Pain reflex

1: Not observed, 2: slowly looking back or slowly moving forward to escape from stimulus,

3: quickly moving forward to escape from stimulus or biting at it immediately after looking back,

4: jumping forward to escape from stimulus, 5: loudly vocalizing and biting at stimulus after suddenly looking back.

Table 21 Grip strength of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
mg/kg	0	45	180	720
Number of males	6	6	6	6
Forelimb	1052 ± 276	975 ± 328	1115 ± 242	1098 ± 208
Hindlimb	162 ± 59	103 ± 46	118 ± 31	124 ± 27

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 22 Grip strength of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	mg/kg	0	45	180	720
Number of females		6	6	6	6
Forelimb		939 ± 234	827 ± 225	904 ± 208	937 ± 88
Hindlimb		113 ± 29	81 ± 25	76 ± 17	125 ± 59

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 23 Spontaneous motor activity of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene					
	0	45	180		720			
Number of males	6	6	6		6			
Ambulatory counts								
Minutes after administration								
10	573 ± 493		645 ± 517		1048 ± 535		1007 ± 568	
20	242 ± 278		317 ± 322		240 ± 232		249 ± 285	
30	110 ± 142		174 ± 220		115 ± 145		292 ± 276	
40	64 ± 65		57 ± 61		81 ± 95		167 ± 174	
50	167 ± 313		94 ± 87		87 ± 101		100 ± 173	
60	93 ± 136		59 ± 76		112 ± 144		106 ± 110	
Total	1249 ± 1221		1346 ± 1003		1682 ± 874		1921 ± 1354	
Vertical counts								
Minutes after administration								
10	28 ± 14		37 ± 28		42 ± 21		61 ± 34	
20	14 ± 12		19 ± 16		13 ± 11		23 ± 27	
30	7 ± 11		14 ± 17		12 ± 21		25 ± 20	
40	2 ± 3		9 ± 19		4 ± 6		14 ± 15	
50	2 ± 4		11 ± 21		6 ± 9		16 ± 24	
60	4 ± 6		11 ± 19		5 ± 8		15 ± 19	
Total	57 ± 30		101 ± 111		82 ± 43		154 ± 129	

Each value shows mean ± S.D.

Table 24 Spontaneous motor activity of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene					
	0	45	180		720			
Number of females	6	6	6		6			
Ambulatory counts								
Minutes after administration								
10	1837 ± 925		1576 ± 767		1338 ± 649		1516 ± 1161	
20	672 ± 553		277 ± 212		225 ± 388		659 ± 574	
30	172 ± 189		92 ± 123		132 ± 249		395 ± 481	
40	355 ± 451		26 ± 57		108 ± 173		233 ± 336	
50	320 ± 520		154 ± 274		75 ± 130		585 ± 1192	
60	217 ± 177		174 ± 192		100 ± 203		215 ± 325	
Total	3572 ± 1905		2298 ± 1139		1978 ± 1005		3601 ± 3674	
Vertical counts								
Minutes after administration								
10	33 ± 12		36 ± 16		31 ± 19		34 ± 14	
20	13 ± 9		9 ± 8		4 ± 8		13 ± 8	
30	2 ± 3		3 ± 3		4 ± 7		7 ± 6	
40	6 ± 6		1 ± 3		3 ± 4		4 ± 8	
50	6 ± 7		4 ± 7		1 ± 2		7 ± 12	
60	8 ± 12		3 ± 3		3 ± 7		4 ± 9	
Total	67 ± 29		56 ± 25		46 ± 27		70 ± 44	

Each value shows mean ± S.D.

Table 25-1 Urinary examination of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of males	6	6	6	6	
Volume (mL): Mean ± S.D.	9.2 ± 1.7	10.9 ± 3.2	10.1 ± 1.8	25.6 ± 5.0 **	
Specific gravity: Mean ± S.D.	1.059 ± 0.012	1.053 ± 0.010	1.052 ± 0.008	1.031 ± 0.004 **	
Color					
Light yellow	6	6	6	6	
pH					
8.0	0	0	1	0	
8.5	1	3	2	4	
9.0	5	3	3	2	
Protein					
10~20 mg/dL	0	3	1	1	
30 mg/dL	3	0	2	4	
100 mg/dL	3	3	3	1	
Glucose					
Negative	6	6	6	6	
Ketone body					
Negative	4	6	3	6	
Slight	2	0	3	0	
Bilirubin					
Negative	6	6	6	6	
Occult blood					
Negative	5	4	4	5	
Trace	1	2	1	1	
Moderate	0	0	1	0	
Urobilinogen					
Normal	5	6	6	6	
1 mg/dL	1	0	0	0	

Significantly different from control group (**: P<0.01).

Table 25-2 Urinary examination of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
		45	180	720
Number of males	6	6	6	6
Urinary sediments				
Epithelial cells				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	5
101~200 cells/100fields	0	0	0	1
Erythrocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	5	6
21~100 cells/100 fields	0	0	1	0
Leukocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Casts				
Not observed	6	6	6	6
Crystals				
Not observed	3	4	1	1
Observed	3	2	5	5

Table 26-1 Urinary examination of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	mg/kg	0	45	180	720
Number of females		6	6	6	6
Volume (mL): Mean ± S.D.	30.1 ± 5.9		26.6 ± 8.6	37.5 ± 4.8	41.6 ± 17.3
Specific gravity: Mean ± S.D.	1.024 ± 0.003		1.028 ± 0.007	1.023 ± 0.003	1.022 ± 0.007
Color					
Light yellow		6	6	6	6
pH					
5.5		0	0	1	0
6.0		0	0	1	1
6.5		1	2	1	0
7.0		1	2	1	1
7.5		2	0	2	0
8.0		1	0	0	1
8.5		0	2	0	3
9.0		1	0	0	0
Protein					
Negative		5	3	4	2
10~20 mg/dL		1	2	2	3
30 mg/dL		0	1	0	1
Glucose					
Negative		6	6	6	6
Ketone body					
Negative		6	6	6	6
Bilirubin					
Negative		6	6	6	6
Occult blood					
Negative		6	5	6	6
Slight		0	1	0	0
Urobilinogen					
Normal		6	6	6	6

Table 26-2 Urinary examination of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
		45	180	720
Number of females	6	6	6	6
Urinary sediments				
Epithelial cells				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Erythrocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Leukocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Casts				
Not observed	6	6	6	6
Crystals				
Not observed	1	3	5	4
Observed	5	3	1	2

Table 27-1 Urinary examination of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of males	6	6	6	6	
Volume (mL): Mean ± S.D.	12.1 ± 5.9	14.0 ± 4.7	17.1 ± 4.8	17.8 ± 3.5	
Specific gravity: Mean ± S.D.	1.053 ± 0.014	1.052 ± 0.013	1.047 ± 0.010	1.049 ± 0.010	
Color					
Light yellow	6	6	6	6	
pH					
8.5	1	4	4	5	
9.0	5	2	2	1	
Protein					
10~20 mg/dL	1	1	0	0	
30 mg/dL	2	3	3	2	
100 mg/dL	2	2	2	4	
300 mg/dL	1	0	0	0	
1000 mg/dL	0	0	1	0	
Glucose					
Negative	6	6	6	6	
Ketone body					
Negative	3	5	4	5	
Slight	3	1	2	1	
Bilirubin					
Negative	6	6	6	6	
Occult blood					
Negative	6	6	6	6	
Urobilinogen					
Normal	5	6	6	6	
1 mg/dL	1	0	0	0	

Table 27-2 Urinary examination of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
		45	180	720
Number of males	6	6	6	6
Urinary sediments				
Epithelial cells				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Erythrocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Leukocytes				
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6
Casts				
Not observed	6	6	6	6
Crystals				
Not observed	4	4	3	0
Observed	2	2	3	6

Table 28-1 Urinary examination of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
	0		180	720
Number of females	6		6	5
Volume (mL): Mean ± S.D.	14.2 ± 4.7		12.8 ± 6.2	12.7 ± 4.9
Specific gravity: Mean ± S.D.	1.045 ± 0.014		1.047 ± 0.015	1.041 ± 0.009
Color				
Light yellow	6		6	5
pH				
7.5	0		0	1
8.0	0		1	1
8.5	4		3	2
9.0	2		2	1
Protein				
Negative	2		2	0
10~20 mg/dL	2		2	2
30 mg/dL	2		2	0
100 mg/dL	0		0	3
Glucose				
Negative	6		6	5
Ketone body				
Negative	6		5	5
Slight	0		1	0
Bilirubin				
Negative	6		6	5
Occult blood				
Negative	6		5	4
Trace	0		1	1
Urobilinogen				
Normal	6		5	5
1 mg/dL	0		1	0

Table 28-2 Urinary examination of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
mg/kg	0	180	720
Number of females	6	6	4
Urinary sediments			
Epithelial cells			
0~20 cells/100 fields	6	6	5
Erythrocytes			
0~20 cells/100 fields	6	6	5
Leukocytes			
0~20 cells/100 fields	6	6	5
Casts			
Not observed	6	6	5
Crystals			
Not observed	2	3	1
Observed	4	3	4

Table 29 Hematological examination of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
	0		45	180	720	
Number of males	6		6	6	6	
RBC (10 ⁶ /μL)	830 ± 25		836 ± 21	820 ± 21	802 ± 26	
HGB (g/dL)	15.5 ± 0.5		15.5 ± 0.3	15.3 ± 0.5	15.0 ± 0.6	
HCT (%)	46.1 ± 1.5		45.8 ± 0.9	45.6 ± 2.1	44.5 ± 1.6	
MCV (fL)	55.6 ± 0.7		54.8 ± 2.3	55.5 ± 2.0	55.5 ± 0.8	
MCH (pg)	18.7 ± 0.4		18.5 ± 0.7	18.7 ± 0.5	18.7 ± 0.3	
MCHC (g/dL)	33.6 ± 0.5		33.8 ± 0.4	33.7 ± 0.5	33.6 ± 0.6	
PLT (10 ³ /μL)	96.9 ± 8.5		96.9 ± 8.2	101.9 ± 8.0	105.3 ± 8.0	
RET (%)	24 ± 9		25 ± 2	23 ± 4	23 ± 7	
PT (sec.)	18.7 ± 2.5		22.6 ± 3.2	30.3 ± 4.5 **	28.3 ± 6.6 **	
APTT (sec.)	23.4 ± 2.5		26.9 ± 2.3	34.7 ± 4.5 **	38.7 ± 4.8 **	
Fbg (mg/dL)	219.4 ± 14.1		217.9 ± 10.9	233.1 ± 18.9	252.4 ± 16.9 **	
WBC (10 ³ /μL)	74 ± 17		62 ± 17	73 ± 20	64 ± 20	
Differential leukocyte (%)						
Lymphocyte	84.8 ± 6.3		85.3 ± 5.7	85.8 ± 5.1	84.8 ± 4.1	
Neutrophil	13.8 ± 5.8		13.7 ± 5.5	13.0 ± 4.9	14.5 ± 4.1	
Eosinophil	0.7 ± 0.8		0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5	
Basophil	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Monocyte	0.7 ± 0.8		0.7 ± 0.5	0.8 ± 0.4	0.2 ± 0.4	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (**: P<0.01).

Table 30 Hematological examination of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
	0		45	180	720	
Number of females	6		6	6	6	
RBC (10 ⁶ /μL)	749 ± 21		752 ± 52	702 ± 28	679 ± 66 *	
HGB (g/dL)	14.7 ± 0.4		14.7 ± 0.8	14.0 ± 0.3	13.6 ± 1.0	
HCT (%)	43.4 ± 1.4		43.2 ± 2.4	40.7 ± 1.1	40.1 ± 3.1 *	
MCV (fL)	57.9 ± 1.4		57.5 ± 1.5	58.1 ± 1.6	59.2 ± 2.1	
MCH (pg)	19.7 ± 0.6		19.6 ± 0.7	19.9 ± 0.8	20.1 ± 0.8	
MCHC (g/dL)	34.0 ± 0.5		34.1 ± 0.3	34.3 ± 0.7	34.0 ± 0.4	
PLT (10 ³ /μL)	109.7 ± 10.9		92.8 ± 26.5	105.6 ± 6.2	130.4 ± 15.1	
RET (%)	55 ± 9		51 ± 8	58 ± 12	64 ± 11	
PT (sec.)	16.2 ± 0.6		15.4 ± 0.2 *	15.0 ± 0.5 **	14.7 ± 0.6 **	
APTT (sec.)	16.9 ± 1.9		18.4 ± 0.5	18.1 ± 1.2	21.5 ± 1.8 **	
Fbg (mg/dL)	231.2 ± 12.5		237.5 ± 61.8	285.6 ± 82.6	210.4 ± 23.5	
WBC (10 ³ /μL)	39 ± 8		49 ± 8	61 ± 19 *	56 ± 18	
Differential leukocyte (%)						
Lymphocyte	85.2 ± 7.2		84.0 ± 7.1	81.3 ± 9.1	87.2 ± 1.7	
Neutrophil	13.8 ± 6.4		14.7 ± 6.7	17.7 ± 9.2	12.2 ± 1.7	
Eosinophil	0.5 ± 0.8		0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	
Basophil	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Monocyte	0.5 ± 0.5		1.0 ± 0.6	0.7 ± 0.8	0.5 ± 0.5	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 31 Hematological examination of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
	0	45	180	720		
Number of males	6	6	6	6		
RBC (10 ⁶ /μL)	861 ± 21	854 ± 11	851 ± 39	846 ± 53		
HGB (g/dL)	15.7 ± 0.5	15.5 ± 0.6	15.6 ± 0.6	15.1 ± 0.7		
HCT (%)	46.4 ± 1.8	45.7 ± 1.3	46.0 ± 2.1	44.9 ± 2.5		
MCV (fL)	53.9 ± 1.7	53.6 ± 1.3	54.1 ± 1.1	53.1 ± 0.7		
MCH (pg)	18.2 ± 0.5	18.1 ± 0.6	18.3 ± 0.3	17.9 ± 0.3		
MCHC (g/dL)	33.8 ± 0.2	33.8 ± 0.5	33.9 ± 0.4	33.6 ± 0.4		
PLT (10 ³ /μL)	100.7 ± 13.6	95.1 ± 16.9	97.1 ± 6.7	106.8 ± 10.0		
RET (%)	26 ± 5	26 ± 5	25 ± 5	34 ± 9		
PT (sec.)	19.3 ± 3.2	17.5 ± 1.6	17.6 ± 1.9	22.2 ± 3.5		
APTT (sec.)	23.5 ± 1.6	22.2 ± 1.6	22.3 ± 1.4	24.4 ± 1.8		
Fbg (mg/dL)	196.6 ± 7.9	205.4 ± 17.4	212.9 ± 10.6	199.8 ± 10.0		
WBC (10 ³ /μL)	57 ± 19	59 ± 19	61 ± 11	44 ± 7		
Differential leukocyte (%)						
Lymphocyte	87.5 ± 4.1	87.5 ± 5.0	87.3 ± 5.5	84.2 ± 6.8		
Neutrophil	12.0 ± 4.1	11.2 ± 4.4	11.8 ± 5.2	15.2 ± 6.2		
Eosinophil	0.2 ± 0.4	0.7 ± 0.8	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5		
Basophil	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
Monocyte	0.3 ± 0.5	0.7 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.5		

Each value shows mean ± S.D.

Table 32 Hematological examination of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
	0	6	180	6	720	5
Number of females		6		6		5
RBC (10 ⁶ /μL)	785 ± 20		800 ± 31		796 ± 26	
HGB (g/dL)	15.2 ± 0.6		15.2 ± 0.3		14.9 ± 0.5	
HCT (%)	43.7 ± 1.2		44.1 ± 1.2		43.4 ± 1.1	
MCV (fL)	55.7 ± 0.9		55.2 ± 1.2		54.6 ± 1.8	
MCH (pg)	19.4 ± 0.4		19.0 ± 0.6		18.8 ± 0.9	
MCHC (g/dL)	34.9 ± 0.4		34.5 ± 0.5		34.4 ± 0.6	
PLT (10 ³ /μL)	103.0 ± 12.2		106.8 ± 12.6		105.4 ± 11.0	
RET (%)	21 ± 2		24 ± 6		23 ± 5	
PT (sec.)	15.7 ± 0.5		15.1 ± 0.9		15.4 ± 0.1	
APTT (sec.)	18.3 ± 1.4		17.6 ± 0.9		18.4 ± 0.7	
Fbg (mg/dL)	169.0 ± 11.6		162.9 ± 15.5		175.8 ± 14.4	
WBC (10 ³ /μL)	34 ± 9		31 ± 6		34 ± 12	
Differential leukocyte (%)						
Lymphocyte	83.3 ± 7.1		84.8 ± 8.0		83.2 ± 4.6	
Neutrophil	15.7 ± 6.8		13.3 ± 7.8		15.6 ± 4.9	
Eosinophil	0.7 ± 0.5		1.2 ± 1.2		0.6 ± 0.9	
Basophil	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0	
Monocyte	0.3 ± 0.8		0.7 ± 0.8		0.6 ± 0.5	

Each value shows mean ± S.D.

Table 33 Blood chemical examination of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of males	6	6	6	6	
AST (IU/L)	114.8 ± 89.5	72.7 ± 11.7	65.1 ± 9.5	61.5 ± 8.3 **	
ALT (IU/L)	49.2 ± 47.5	33.2 ± 9.2	37.4 ± 14.7	38.9 ± 10.9	
ALP (IU/L)	365.8 ± 52.5	368.7 ± 78.6	357.8 ± 36.7	389.0 ± 131.6	
γ-GTP (IU/L)	0.53 ± 0.17	0.33 ± 0.18	1.39 ± 0.71	2.62 ± 0.87 **	
TP (g/dL)	5.59 ± 0.17	5.62 ± 0.23	5.86 ± 0.18	6.40 ± 0.40 **	
Alb (g/dL)	2.76 ± 0.12	2.80 ± 0.15	2.92 ± 0.13	3.29 ± 0.20 **	
A/G	0.98 ± 0.04	0.99 ± 0.05	1.00 ± 0.06	1.06 ± 0.04 *	
T-Bil (mg/dL)	0.13 ± 0.05	0.09 ± 0.04	0.15 ± 0.01	0.27 ± 0.05 *	
UN (mg/dL)	14.8 ± 2.4	13.2 ± 1.4	14.6 ± 2.0	14.3 ± 2.2	
CRE (mg/dL)	0.30 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.01	
Glu (mg/dL)	127.3 ± 9.4	118.7 ± 13.0	121.8 ± 5.5	114.8 ± 12.5	
T-Cho (mg/dL)	55.2 ± 12.4	55.5 ± 11.6	65.3 ± 9.9	125.9 ± 34.2 **	
TG (mg/dL)	21.0 ± 5.2	35.8 ± 16.7	15.1 ± 6.2	13.2 ± 6.1	
Na (mEq/L)	144.5 ± 1.3	144.9 ± 1.0	144.6 ± 1.6	144.4 ± 1.2	
K (mEq/L)	4.37 ± 0.20	4.39 ± 0.20	4.03 ± 0.16 *	4.29 ± 0.24	
Cl (mEq/L)	106.2 ± 1.2	105.8 ± 1.0	105.2 ± 1.8	104.0 ± 1.1 *	
Ca (mg/dL)	9.5 ± 0.3	9.6 ± 0.4	10.0 ± 0.2 *	10.3 ± 0.4 **	
IP (mg/dL)	6.6 ± 0.6	6.6 ± 0.8	6.3 ± 0.5	6.2 ± 0.4	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 34 Blood chemical examination of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
	0	45	180	720		
Number of females	6	6	6	6		
AST (IU/L)	82.0 ± 18.1	91.1 ± 15.5	104.3 ± 25.0	110.5 ± 54.4		
ALT (IU/L)	23.2 ± 3.7	27.3 ± 4.6	25.2 ± 0.7	54.6 ± 63.7		
ALP (IU/L)	238.6 ± 39.4	178.0 ± 17.9	215.9 ± 92.8	209.8 ± 67.9		
γ-GTP (IU/L)	0.49 ± 0.04	1.29 ± 1.41	1.07 ± 0.76	3.42 ± 1.48 **		
TP (g/dL)	6.09 ± 0.21	6.30 ± 0.41	6.60 ± 0.19 *	6.64 ± 0.44 *		
Alb (g/dL)	3.14 ± 0.12	3.14 ± 0.26	3.07 ± 0.23	3.41 ± 0.24		
A/G	1.07 ± 0.08	1.00 ± 0.08	0.88 ± 0.15 *	1.06 ± 0.07		
T-Bil (mg/dL)	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.20 ± 0.04 *		
UN (mg/dL)	17.0 ± 2.4	19.3 ± 2.6	21.7 ± 7.1	16.5 ± 1.8		
CRE (mg/dL)	0.33 ± 0.03	0.36 ± 0.05	0.36 ± 0.05	0.33 ± 0.03		
Glu (mg/dL)	120.7 ± 10.6	112.4 ± 5.7	105.2 ± 8.0	93.2 ± 18.6 **		
T-Cho (mg/dL)	74.2 ± 13.6	60.4 ± 8.4	64.0 ± 10.2	76.2 ± 21.5		
TG (mg/dL)	21.1 ± 7.0	27.5 ± 9.8	31.3 ± 9.3	30.7 ± 10.4		
Na (mEq/L)	142.2 ± 0.4	141.1 ± 1.1	138.2 ± 4.6	141.8 ± 1.5		
K (mEq/L)	4.07 ± 0.38	4.10 ± 0.24	4.32 ± 0.28	4.32 ± 0.29		
Cl (mEq/L)	105.4 ± 0.7	105.0 ± 1.4	101.2 ± 3.7 *	103.8 ± 1.4		
Ca (mg/dL)	10.6 ± 0.3	10.9 ± 0.3	11.0 ± 0.5	10.8 ± 0.4		
IP (mg/dL)	6.7 ± 0.7	6.7 ± 0.6	7.0 ± 0.5	6.4 ± 0.9		

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 35 Blood chemical examination of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of males	6	6	6	6	
AST (IU/L)	89.7 ± 11.8	84.1 ± 6.1	87.9 ± 10.7	78.8 ± 5.0	
ALT (IU/L)	28.1 ± 6.2	29.8 ± 6.5	31.1 ± 5.1	32.1 ± 6.3	
ALP (IU/L)	277.4 ± 49.2	334.8 ± 69.2	330.1 ± 72.8	278.1 ± 72.4	
γ-GTP (IU/L)	0.42 ± 0.15	0.45 ± 0.17	0.61 ± 0.21	0.81 ± 0.27 **	
TP (g/dL)	5.46 ± 0.28	5.38 ± 0.22	5.69 ± 0.16	5.53 ± 0.36	
Alb (g/dL)	2.75 ± 0.08	2.69 ± 0.17	2.90 ± 0.16	2.75 ± 0.15	
A/G	1.02 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.04 ± 0.07	1.00 ± 0.10	
T-Bil (mg/dL)	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.02	
UN (mg/dL)	17.2 ± 2.8	17.3 ± 2.6	16.5 ± 2.6	16.7 ± 1.6	
CRE (mg/dL)	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.03	
Glu (mg/dL)	117.6 ± 6.3	140.4 ± 21.1	116.9 ± 6.6	115.5 ± 11.4	
T-Cho (mg/dL)	56.4 ± 12.6	61.5 ± 12.2	68.1 ± 18.3	60.6 ± 16.5	
TG (mg/dL)	35.5 ± 18.6	44.0 ± 38.6	36.9 ± 16.1	28.7 ± 9.4	
Na (mEq/L)	138.1 ± 0.9	138.0 ± 0.9	138.2 ± 1.0	138.0 ± 0.7	
K (mEq/L)	4.26 ± 0.17	4.11 ± 0.18	4.21 ± 0.10	4.30 ± 0.10	
Cl (mEq/L)	100.7 ± 1.2	100.4 ± 0.2	100.6 ± 0.7	100.5 ± 0.6	
Ca (mg/dL)	9.3 ± 0.3	9.3 ± 0.2	9.5 ± 0.2	9.5 ± 0.4	
IP (mg/dL)	6.4 ± 0.5	6.6 ± 0.5	6.5 ± 0.4	6.9 ± 0.7	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (**: P<0.01).

Table 36 Blood chemical examination of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
	0		180	720
Number of females	6	6	5	
AST (IU/L)	77.7 ± 9.7		74.4 ± 26.2	70.9 ± 17.3
ALT (IU/L)	25.0 ± 6.0		24.6 ± 4.6	22.3 ± 2.6
ALP (IU/L)	137.1 ± 24.1		127.1 ± 23.5	113.5 ± 14.1
γ-GTP (IU/L)	0.59 ± 0.45		0.59 ± 0.27	0.50 ± 0.36
TP (g/dL)	6.24 ± 0.59		6.43 ± 0.33	6.77 ± 0.29
Alb (g/dL)	3.48 ± 0.37		3.41 ± 0.23	3.71 ± 0.16
A/G	1.26 ± 0.13		1.13 ± 0.07	1.22 ± 0.09
T-Bil (mg/dL)	0.16 ± 0.04		0.15 ± 0.04	0.17 ± 0.03
UN (mg/dL)	18.2 ± 1.3		17.0 ± 1.4	18.5 ± 1.3
CRE (mg/dL)	0.36 ± 0.03		0.34 ± 0.03	0.32 ± 0.03
Glu (mg/dL)	122.6 ± 11.5		123.2 ± 9.2	120.9 ± 13.9
T-Cho (mg/dL)	69.5 ± 12.4		83.8 ± 9.7	99.2 ± 24.4 *
TG (mg/dL)	21.8 ± 11.1		20.3 ± 2.9	25.8 ± 3.9
Na (mEq/L)	133.4 ± 1.3		134.1 ± 1.1	133.4 ± 1.0
K (mEq/L)	3.78 ± 0.36		3.72 ± 0.25	3.71 ± 0.12
Cl (mEq/L)	100.5 ± 0.7		100.1 ± 2.3	97.8 ± 0.9 *
Ca (mg/dL)	9.9 ± 0.6		10.0 ± 0.3	10.4 ± 0.3
IP (mg/dL)	4.6 ± 0.6		5.3 ± 0.6	5.1 ± 0.5

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 37 Necropsy findings of dead female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene
mg/kg	720
Number of dead females	1
Thymus	
Atrophy	1
Spleen	
Atrophy	1

Table 38 Necropsy findings of dead female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene
mg/kg	720
Number of dead females	1
Thymus	
Atrophy	1
Adrenal	
Enlargement	1

Table 39 Necropsy findings of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
mg/kg	0	45	180	720
Number of males	6	6	6	6
Normal	6	6	6	6

Table 40 Necropsy findings of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
mg/kg	0	45	180
Number of dams	11	12	11
Normal	11	12	11
Number of non-pregnant females	1	0	1
Normal	1	-	1

Table 41 Necropsy findings of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
mg/kg	0	45	180	720
Number of males	6	6	6	6
Normal	6	5	6	6
Liver				
Adhesion	0	1	0	0

Table 42 Necropsy findings of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
mg/kg	0	180	720
Number of females	6	6	5
Normal	6	6	5

Table 43 Organ weights of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of males	6	6	6	6	
Body weight (g)	496 ± 34	494 ± 38	474 ± 24	446 ± 26 *	
Brain (g)	2.05 ± 0.05	2.06 ± 0.06	2.11 ± 0.09	2.05 ± 0.07	
(g%)	0.41 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.46 ± 0.03 *	
Pituitary (mg)	14.3 ± 1.3	13.5 ± 1.3	15.3 ± 1.3	14.2 ± 1.5	
(mg%)	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.3	
Thyroids (mg)	22.5 ± 4.7	23.7 ± 4.9	24.0 ± 2.6	29.1 ± 4.0 *	
(mg%)	4.5 ± 0.8	4.8 ± 1.1	5.1 ± 0.6	6.6 ± 1.0 **	
Thymus (mg)	278 ± 41	270 ± 28	289 ± 53	265 ± 64	
(mg%)	56 ± 7	55 ± 6	61 ± 11	59 ± 12	
Heart (g)	1.52 ± 0.13	1.54 ± 0.10	1.55 ± 0.14	1.44 ± 0.16	
(g%)	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.03	
Liver (g)	13.26 ± 1.49	15.17 ± 1.37 *	17.22 ± 1.27 **	19.95 ± 0.64 **	
(g%)	2.67 ± 0.17	3.07 ± 0.22 *	3.64 ± 0.17 **	4.49 ± 0.34 **	
Spleen (mg)	762 ± 129	665 ± 106	690 ± 81	735 ± 109	
(mg%)	153 ± 20	135 ± 22	146 ± 14	164 ± 20	
Kidneys (g)	2.96 ± 0.20	3.02 ± 0.31	3.49 ± 0.34 **	3.49 ± 0.21 **	
(g%)	0.60 ± 0.03	0.61 ± 0.04	0.74 ± 0.06 **	0.78 ± 0.03 **	
Adrenals (mg)	55.8 ± 8.2	63.4 ± 9.1	62.9 ± 8.2	58.8 ± 6.2	
(mg%)	11.3 ± 1.9	12.9 ± 1.7	13.2 ± 1.2	13.2 ± 1.4	
Testes (g)	3.29 ± 0.17	3.44 ± 0.15	3.39 ± 0.34	3.41 ± 0.31	
(g%)	0.67 ± 0.05	0.70 ± 0.06	0.72 ± 0.07	0.77 ± 0.08 *	
Epididymides (g)	1.21 ± 0.06	1.21 ± 0.12	1.21 ± 0.08	1.22 ± 0.06	
(g%)	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.02	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 44 Organ weights of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720	
Number of females	11	12	10	9	
Body weight (g)	279 ± 17	281 ± 14	273 ± 14	266 ± 13	
Brain (g)	1.94 ± 0.04	1.92 ± 0.07	1.92 ± 0.06	1.87 ± 0.08	
(g%)	0.70 ± 0.04	0.69 ± 0.04	0.71 ± 0.03	0.70 ± 0.04	
Pituitary (mg)	15.1 ± 2.1	15.4 ± 2.0	14.3 ± 1.7	13.8 ± 2.4	
(mg%)	5.4 ± 0.8	5.5 ± 0.8	5.3 ± 0.5	5.2 ± 0.7	
Thyroids (mg)	15.8 ± 3.2	16.3 ± 2.3	18.4 ± 5.3	19.8 ± 3.6	
(mg%)	5.7 ± 1.1	5.8 ± 1.0	6.8 ± 1.9	7.5 ± 1.6 *	
Thymus (mg)	223 ± 39	243 ± 61	224 ± 46	236 ± 53	
(mg%)	80 ± 15	87 ± 21	82 ± 16	89 ± 20	
Heart (g)	1.00 ± 0.08	0.98 ± 0.06	0.95 ± 0.09	0.98 ± 0.07	
(g%)	0.36 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03	
Liver (g)	9.13 ± 1.05	9.96 ± 0.47	11.48 ± 0.88 **	13.65 ± 1.51 **	
(g%)	3.27 ± 0.26	3.55 ± 0.20	4.21 ± 0.27 **	5.14 ± 0.57 **	
Spleen (mg)	626 ± 110	653 ± 132	672 ± 125	584 ± 86	
(mg%)	223 ± 30	232 ± 45	246 ± 43	220 ± 31	
Kidneys (g)	1.99 ± 0.28	2.00 ± 0.21	2.12 ± 0.19	2.05 ± 0.20	
(g%)	0.71 ± 0.07	0.71 ± 0.07	0.78 ± 0.08	0.77 ± 0.07	
Adrenals (mg)	74.4 ± 7.5	74.3 ± 6.4	71.9 ± 11.9	71.5 ± 7.8	
(mg%)	26.7 ± 2.4	26.5 ± 2.7	26.4 ± 3.9	26.9 ± 2.7	
Ovaries (mg)	99.7 ± 11.4	95.6 ± 6.6	95.7 ± 8.7	88.9 ± 10.3 *	
(mg%)	35.8 ± 4.3	34.1 ± 2.9	35.2 ± 3.1	33.4 ± 2.7	
Uterus (mg)	640 ± 139	607 ± 155	561 ± 77	518 ± 136	
(mg%)	231 ± 59	218 ± 65	206 ± 31	196 ± 56	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 45 Organ weights of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	
	0	45	180	720
Number of males	6	6	6	6
Body weight (g)	512 ± 15	519 ± 29	515 ± 28	478 ± 41
Brain (g)	2.17 ± 0.09	2.08 ± 0.06	2.15 ± 0.12	2.07 ± 0.09
(g%)	0.42 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.03
Pituitary (mg)	14.5 ± 1.7	14.1 ± 1.7	13.8 ± 1.4	14.1 ± 1.0
(mg%)	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.3	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.3
Thyroids (mg)	18.6 ± 3.2	24.9 ± 4.7 *	20.0 ± 1.8	24.5 ± 4.4 *
(mg%)	3.7 ± 0.6	4.8 ± 0.7 *	3.9 ± 0.4	5.2 ± 0.8 **
Thymus (mg)	309 ± 91	266 ± 74	255 ± 48	287 ± 48
(mg%)	61 ± 19	52 ± 16	49 ± 7	60 ± 10
Heart (g)	1.58 ± 0.13	1.56 ± 0.11	1.63 ± 0.19	1.50 ± 0.14
(g%)	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.02
Liver (g)	12.23 ± 0.93	13.32 ± 1.57	13.59 ± 1.09	14.34 ± 2.39
(g%)	2.38 ± 0.12	2.56 ± 0.17	2.64 ± 0.11	2.98 ± 0.29 **
Spleen (mg)	771 ± 96	809 ± 128	760 ± 138	765 ± 117
(mg%)	150 ± 19	156 ± 19	148 ± 23	160 ± 19
Kidneys (g)	3.13 ± 0.18	3.16 ± 0.25	3.36 ± 0.30	3.36 ± 0.58
(g%)	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.04	0.65 ± 0.04	0.70 ± 0.08 *
Adrenals (mg)	61.3 ± 6.2	57.0 ± 9.9	58.3 ± 9.4	65.4 ± 11.2
(mg%)	12.0 ± 1.3	11.1 ± 2.5	11.4 ± 1.7	13.6 ± 1.5
Testes (g)	3.63 ± 0.20	3.40 ± 0.21	3.46 ± 0.27	3.44 ± 0.18
(g%)	0.71 ± 0.05	0.66 ± 0.03	0.68 ± 0.08	0.72 ± 0.07
Epididymides (g)	1.33 ± 0.15	1.36 ± 0.13	1.32 ± 0.11	1.30 ± 0.15
(g%)	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.02

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 46 Organ weights of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene
	0	180	720
Number of females	6	6	5
Body weight (g)	287 ± 15	272 ± 13	274 ± 15
Brain (g)	1.95 ± 0.07	1.95 ± 0.07	1.97 ± 0.06
(g%)	0.68 ± 0.03	0.72 ± 0.05	0.72 ± 0.04
Pituitary (mg)	14.9 ± 2.2	18.1 ± 2.6	15.9 ± 2.0
(mg%)	5.2 ± 0.7	6.7 ± 1.2 *	5.8 ± 0.7
Thyroids (mg)	16.5 ± 3.5	14.9 ± 2.9	19.3 ± 2.9
(mg%)	5.7 ± 1.2	5.5 ± 1.1	7.0 ± 0.8
Thymus (mg)	256 ± 48	295 ± 55	285 ± 70
(mg%)	90 ± 20	109 ± 21	103 ± 21
Heart (g)	0.93 ± 0.07	0.90 ± 0.08	0.94 ± 0.01
(g%)	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.02
Liver (g)	7.39 ± 0.79	7.22 ± 0.54	8.18 ± 0.58
(g%)	2.57 ± 0.20	2.66 ± 0.09	2.98 ± 0.10 **
Spleen (mg)	547 ± 61	511 ± 93	549 ± 89
(mg%)	191 ± 24	187 ± 29	200 ± 24
Kidneys (g)	1.84 ± 0.11	1.80 ± 0.18	1.90 ± 0.06
(g%)	0.64 ± 0.03	0.66 ± 0.04	0.70 ± 0.03 *
Adrenals (mg)	67.1 ± 6.8	66.0 ± 8.1	68.1 ± 9.9
(mg%)	23.4 ± 2.4	24.3 ± 2.7	24.8 ± 2.7
Ovaries (mg)	78.6 ± 11.7	82.3 ± 8.8	88.5 ± 9.9
(mg%)	27.4 ± 4.2	30.3 ± 2.7	32.3 ± 3.1
Uterus (mg)	637 ± 231	626 ± 200	566 ± 69
(mg%)	223 ± 87	229 ± 64	207 ± 30

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 47 Histopathological findings of dead female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene 720					
	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+
Grade						
Findings						
Whole organs and tissues	[1] ^{c)}					
Postmortal change	0	1	0	1	0	0
Liver	[1]					
Swelling, hepatocyte, centrilobular	0	1	0	1	0	0

a): No abnormality detected.

b): Abnormality detected.

c): Number in brackets is number of females examined.

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Examined heart, lung, trachea, liver, pancreas, sublingual gland, submandibular gland, esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, thymus, spleen, submandibular lymph node, mesenteric lymph node, kidney, urinary bladder, ovary, uterus, vagina, pituitary, adrenal, thyroid, parathyroid, cerebrum, cerebellum, medulla oblongata, spinal cord, sciatic nerve, eyeball, Harderian gland, bone marrow (sternum or femur), bone (sternum or femur), and mammary gland.

Table 48 Histopathological findings of dead female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene					
mg/kg	720					
Grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+
Findings						
Whole organs and tissues	[1] ^{c)}					
Postmortal change	0	1	0	1	0	0
Liver	[1]					
Swelling, hepatocyte, centrilobular	0	1	0	1	0	0

a): No abnormality detected.

b): Abnormality detected.

c): Number in brackets is number of females examined.

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Examined heart, lung, trachea, liver, pancreas, sublingual gland, submandibular gland, esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, thymus, spleen, submandibular lymph node, mesenteric lymph node, kidney, urinary bladder, ovary, uterus, vagina, pituitary, adrenal, thyroid, parathyroid, cerebrum, cerebellum, medulla oblongata, spinal cord, sciatic nerve, eyeball, Harderian gland, bone marrow (sternum or femur), bone (sternum or femur), and mammary gland.

Table 49-1 Histopathological findings of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control						I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene															
	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+				
Grade																						
Findings																						
Heart	[6] ^{c)}						[0]						[0]									
Cellular infiltration	4	2	2	0	0	0	[0]						[0]									
Lung	[6]						[0]						[0]									
Mineralization, vascular wall	6	0	0	0	0	0	[0]						[0]									
Trachea	[6]						[0]						[0]									
Liver	[6]						[6]						[6]									
Swelling, hepatocyte, centrilobular	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	0	*	0	6	0	2	4	0	** ##	
Basophilic change, hepatocyte	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	0	*	0	6	0	6	0	0	** ##	
Necrosis, hepatocyte, focal	5	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0		
Pancreas	[6]						[0]						[0]						[6]			
Sublingual gland	[6]						[0]						[0]						[6]			
Submandibular gland	[6]						[0]						[0]						[6]			
Esophagus	[6]						[0]						[0]						[6]			
Stomach	[6]						[0]						[0]						[6]			
Duodenum	[6]						[0]						[0]						[6]			
Jejunum	[6]						[0]						[0]						[6]			
Mineralization, Peyer's patch	5	1	1	0	0	0	5	1	1	0	0	0	6	0	*	4	2	2	0	0	0	
Ileum	[6]						[0]						[0]						[6]			
Cecum	[6]						[0]						[0]						[6]			
Colon	[6]						[0]						[0]						[6]			
Rectum	[6]						[0]						[0]						[6]			
Thymus	[6]						[0]						[0]						[6]			
Spleen	[6]						[0]						[0]						[6]			
Submandibular lymph node	[6]						[0]						[0]						[6]			
Mesenteric lymph node	[6]						[0]						[0]						[6]			
Kidney	[6]						[6]						[6]						[6]			
Hyaline droplet, tubular epithelium	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	3	3	3	0	0	*	#
Degeneration, tubular epithelium	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	1	1	5	1	1	0	0	0	0
Urinary bladder	[6]						[0]						[0]						[6]			

a): No abnormality detected.

b): Abnormality detected.

c): Number in brackets is number of males examined.

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Significantly different by dose response test (#: P<0.05, ##: P<0.01).

Table 49-2 Histopathological findings of male rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control						1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene												
	0			45			180			720									
Grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	
Findings																			
Testis	[6] ^{c)}						[0]						[0]						[6]
Epididymis	[6]						[0]						[0]						[6]
Seminal vesicle	[6]						[0]						[0]						[6]
Prostate	[6]						[0]						[0]						[6]
Cellular infiltration	3	3	3	0	0	0													6
Pituitary	[6]						[0]						[0]						[6]
Adrenal	[6]						[0]						[0]						[6]
Thyroid	[6]						[6]						[6]						[6]
Follicular cell hyperplasia, diffuse	4	2	1	1	0	0	5	1	1	0	0	0	3	3	2	1	0	0	0
Parathyroid	[5]						[0]						[0]						[6]
Cerebrum	[6]						[0]						[0]						[6]
Cerebellum	[6]						[0]						[0]						[6]
Medulla oblongata	[6]						[0]						[0]						[6]
Spinal cord	[6]						[0]						[0]						[6]
Sciatic nerve	[6]						[0]						[0]						[6]
Eyeball	[6]						[0]						[0]						[6]
Harderian gland	[6]						[0]						[0]						[6]
Bone marrow (sternum or femur)	[6]						[0]						[0]						[6]
Bone (sternum or femur)	[6]						[0]						[0]						[6]

a): No abnormality detected.

b): Abnormality detected.

c): Number in brackets is number of males examined.

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 50-1 Histopathological findings of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control						1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene												
	0			45			180			720									
Grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	
Findings																			
Heart	[6] ^{c)}						[0]						[0]						[6]
Lung	[6]						[0]						[0]						[6]
Trachea	[6]						[0]						[0]						[6]
Liver	[6]						[6]						[6]						[6]
Swelling, hepatocyte, centrilobular	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6	6	6	0	0	*
Basophilic change, hepatocyte	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6	6	6	0	0	**
Pancreas	[6]						[0]						[0]						[6]
Sublingual gland	[6]						[0]						[0]						[6]
Submandibular gland	[6]						[0]						[0]						[6]
Esophagus	[6]						[0]						[0]						[6]
Stomach	[6]						[0]						[0]						[6]
Duodenum	[6]						[0]						[0]						[6]
Jejunum	[6]						[0]						[0]						[6]
Ileum	[6]						[0]						[0]						[6]
Cecum	[6]						[0]						[0]						[6]
Colon	[6]						[0]						[0]						[6]
Rectum	[6]						[0]						[0]						[6]
Thymus	[6]						[0]						[0]						[6]
Spleen	[6]						[0]						[0]						[6]
Hematopoiesis, extramedullary	3	3	3	0	0	0													2
Submandibular lymph node	[6]						[0]						[0]						[6]
Mesenteric lymph node	[6]						[0]						[0]						[6]
Kidney	[6]						[6]						[6]						[6]
Proliferation, collecting tubular epithelium	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5
Dilatation, urinary tubule	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5
Urinary bladder	[6]						[0]						[0]						[6]

a): No abnormality detected.

b): Abnormality detected.

c): Number in brackets is number of females examined.

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Significantly different by dose response test (##: P<0.01).

Table 50-2 Histopathological findings of female rats on termination of administration period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control						1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene																		
	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+							
Grade																									
Findings																									
Ovary	[6] ^{c)}						[0]						[0]						[6]						
Uterus	[6]						[0]						[0]						[6]						
Vagina	[6]						[0]						[0]						[6]						
Pituitary	[6]						[0]						[0]						[6]						
Adrenal	[6]						[0]						[0]						[6]						
Thyroid	[6]						[6]						[6]						[6]						
Follicular cell hyperplasia, diffuse	6	0	0	0	0	0	4	2	2	0	0	0	5	1	1	0	0	0	3	3	3	0	0	0	
Parathyroid	[6]						[0]						[0]						[6]						
Cerebrum	[6]						[0]						[0]						[6]						
Cerebellum	[6]						[0]						[0]						[6]						
Medulla oblongata	[6]						[0]						[0]						[6]						
Spinal cord	[6]						[0]						[0]						[6]						
Sciatic nerve	[6]						[0]						[0]						[6]						
Eyeball	[6]						[0]						[0]						[6]						
Harderian gland	[6]						[0]						[0]						[6]						
Bone marrow (sternum or femur)	[6]						[0]						[0]						[6]						
Bone (sternum or femur)	[6]						[0]						[0]						[6]						
Mammary gland	[6]						[0]						[0]						[6]						

a): No abnormality detected.

b): Abnormality detected.

c): Number in brackets is number of females examined.

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Table 51 Histopathological findings of male rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control						I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene												
	0			45			180			720									
Grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	
Findings																			
Liver	[6] ^{c)}						[6]						[6]						[6]
Swelling, hepatocyte, centrilobular	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	0
Adhesion	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6
Kidney	[6]						[6]						[6]						[6]
Hyaline droplet, tubular epithelium	5	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	6
Degeneration, tubular epithelium	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5
Thyroid	[6]						[6]						[6]						[6]
Follicular cell hyperplasia, diffuse	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	4	2	2	0	0	0	3
Ectopic, thymic tissue	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6

a): No abnormality detected.

b): Abnormality detected.

c): Number in brackets is number of males examined.

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Significantly different from control group (**: P<0.01).

Significantly different by dose response test (##: P<0.01).

Table 52 Histopathological findings of female rats on termination of recovery period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control						1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene												
	0						180						720						
Grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	
Findings																			
Liver	[6] ^{c)}						[6]						[5]						
Swelling, hepatocyte, centrilobular	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	3	2	2	0	0	0	0
Kidney	[6]						[6]						[5]						
Cyst, left	6	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
Thyroid	[6]						[6]						[5]						

a): No abnormality detected.

b): Abnormality detected.

c): Number in brackets is number of females examined.

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Table 53 Reproductive functions of male rats and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
	0	45	180	720
Number of females	12	12	12	11
Number of estrous cases before pairing (14 days) Mean±S.D.	3.5 ± 0.5	3.3 ± 0.5	3.4 ± 0.5	2.9 ± 0.8
Number of pairs	12	12	12	11
Number of pairs with successful copulation	12	12	12	11
Copulation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of conceiving days Mean±S.D.	2.8 ± 1.1	2.4 ± 1.3	3.8 ± 4.4	2.4 ± 1.3
Conceiving days 1-5	12	12	10	11
Conceiving days ≥6	0	0	2	0
Number of pregnant females	11	12	11	10
Fertility index (%) ^{b)}	91.7	100.0	91.7	90.9

a): (Number of pairs with successful copulation / number of pairs)×100.

b): (Number of pregnant females / number of pairs with successful copulation)×100.

Table 54 Observation of pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
	0		45	180	720	
Number of dams	11		12	11	10	
Length of gestation (days)	22.1 ± 0.3		22.1 ± 0.5	22.0 ± 0.0	22.5 ± 0.5	
Pregnancy days = 21	0		1	0	0	
Pregnancy days = 22	10		9	11	5	
Pregnancy days ≥ 23	1		2	0	5	
Corpora lutea	15.9 ± 1.7		14.7 ± 1.5	15.7 ± 1.1	12.2 ± 3.3 **	
Implantation scars	14.9 ± 1.6		14.1 ± 1.3	14.8 ± 1.2	9.1 ± 4.0 **	
Implantation index (%) ^{a)}	93.8 ± 4.8		96.2 ± 4.3	94.3 ± 5.0	74.1 ± 24.5	
Gestation index (%) ^{b)}	100.0		100.0	100.0	100.0	
Pups born	13.7 ± 2.0		13.4 ± 1.4	14.2 ± 1.1	8.0 ± 3.9 **	
Stillbirths	0.3 ± 0.5		0.2 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.6	
Live pups born	13.5 ± 1.9		13.3 ± 1.7	14.2 ± 1.1	7.2 ± 3.6 **	
Sex ratio at birth ^{c)} (Total male/total female)	0.96 ± 0.35 69/79		1.00 ± 0.53 73/86	1.03 ± 0.56 74/82	1.13 ± 0.97 31/41	
Delivery index (%) ^{d)}	90.2 ± 6.3		94.2 ± 8.9	95.8 ± 4.4	79.9 ± 21.7	
Birth index (%) ^{e)}	90.4 ± 6.2		94.2 ± 9.0	95.8 ± 4.3	80.0 ± 21.6	
Live birth index (%) ^{f)}	98.2 ± 3.2		98.6 ± 4.9	100.0 ± 0.0	92.1 ± 15.1	
Live pups on Day 4 of lactation	13.4 ± 2.0		12.9 ± 1.8	12.8 ± 4.4	7.0 ± 3.9 **	
Sex ratio on Day 4 of lactation ^{c)} (Total male/total female)	0.94 ± 0.36 68/79		1.00 ± 0.53 71/84	1.01 ± 0.58 66/75	1.14 ± 1.03 (10) 30/40	(9)
Viability index (%) ^{g)}	99.2 ± 2.5		97.4 ± 4.0	90.3 ± 30.0	90.0 ± 31.6	
External abnormalities (%) ^{h)}	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	

Each value shows mean ± S.D. per dam.

Significantly different from control group (**: P<0.01).

Figures in parentheses indicate number of dams.

a): (Number of implantation scars/number of corpora lutea)×100.

c): Number of male pups/number of female pups.

e): (Number of live pups born/number of implantation scars)×100.

g): (Number of live pups on Day 4/number of live pups born)×100.

b): (Number of dams with live pups/number of pregnant dams)×100.

d): (Number of pups born/number of implantation scars)×100.

f): (Number of live pups born/number of pups born)×100.

h): (Number of pups with external abnormalities/number of live pups)×100.

Table 55 Delivery conditions and nursing conditions of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and delivery conditions/nursing conditions	Delivery conditions	Nursing conditions				
				Days of lactation				
				0	1	2	3	4
Control	0	Number of dams Normal	11 11	11 11	11 11	11 11	11 11	11 11
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	45	Number of dams Normal	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12
	180	Number of dams Normal Faulty nest-building Faulty nipple development	11 11 -	11 11 0	11 11 0	11 10 1	11 10 1	10 10 0
		Number of dams Normal	10 10	10 10	9 9	9 9	9 9	9 9

Table 56 General signs of pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of $l,l'-(1,1\text{-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl})\text{bisbenzene}$ by oral administration

Group	mg/kg	Number of pups and general signs	Days of lactation				
			0	1	2	3	4
Control	0	Number of pups	151	148	148	147	147
		Normal	148	148	147	147	147
		Death	3	0	1	0	0
$l,l'-(1,1\text{-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl})\text{bisbenzene}$	45	Number of pups	161	159	158	157	156
		Normal	159	158	157	156	155
		Death	2	1	1	1	1
	180	Number of pups	156	156	156	155	153
		Normal	156	156	141	141	141
		Hypothermia	0	0	14	12	0
		Death	0	0	1	2	12
	720	Number of pups	80	72	70	70	70
		Normal	72	70	70	70	70
		Death	8	2	0	0	0

Table 57 Body weights of pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of
I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group mg/kg	Control		I,I'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene			
	0	45	180	720		
Number of dams	11	12	11	10		
Male weight						
Days of lactation						
0	6.7 ± 0.4	6.7 ± 0.7	6.7 ± 0.4	7.4 ± 0.5 **		
4	10.6 ± 1.1	10.9 ± 1.2	9.8 ± 0.8 (10)	12.2 ± 1.3 ** (9)		
Female weight						
Days of lactation						
0	6.4 ± 0.5	6.5 ± 0.8	6.3 ± 0.4	6.9 ± 0.5		
4	10.1 ± 1.3	10.5 ± 1.4	9.2 ± 0.9 (10)	11.4 ± 1.2 (9)		
Mean pups weight						
Days of lactation						
0	6.5 ± 0.4	6.6 ± 0.7	6.5 ± 0.4	7.2 ± 0.4 *		
4	10.3 ± 1.2	10.7 ± 1.3	9.5 ± 0.8 (10)	11.8 ± 1.2 * (9)		
Litter weight						
Days of lactation						
0	87.2 ± 11.2	87.1 ± 11.6	91.6 ± 7.3	52.2 ± 26.9 *		
4	136.1 ± 16.2	136.2 ± 15.3	133.7 ± 12.5 (10)	89.8 ± 34.0 * (9)		

Each value shows mean (g) ± S.D. per dam.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Figures in parentheses indicate number of dams.

Table 58 Necropsy findings of dead pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
mg/kg	0	45	180	720
Number of dams	2	2	2	2
Number of dead pups	2	3	13	3
Normal	2	3	13	3
Abnormal	0	0	0	0

Table 59 Necropsy findings of pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

Group	Control	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene		
mg/kg	0	45	180	720
Number of dams	11	12	10	9
Number of male pups	68	71	66	30
Normal	68	71	66	30
Abnormal	0	0	0	0
Number of dams	11	12	10	9
Number of female pups	79	84	75	40
Normal	79	84	75	40
Abnormal	0	0	0	0

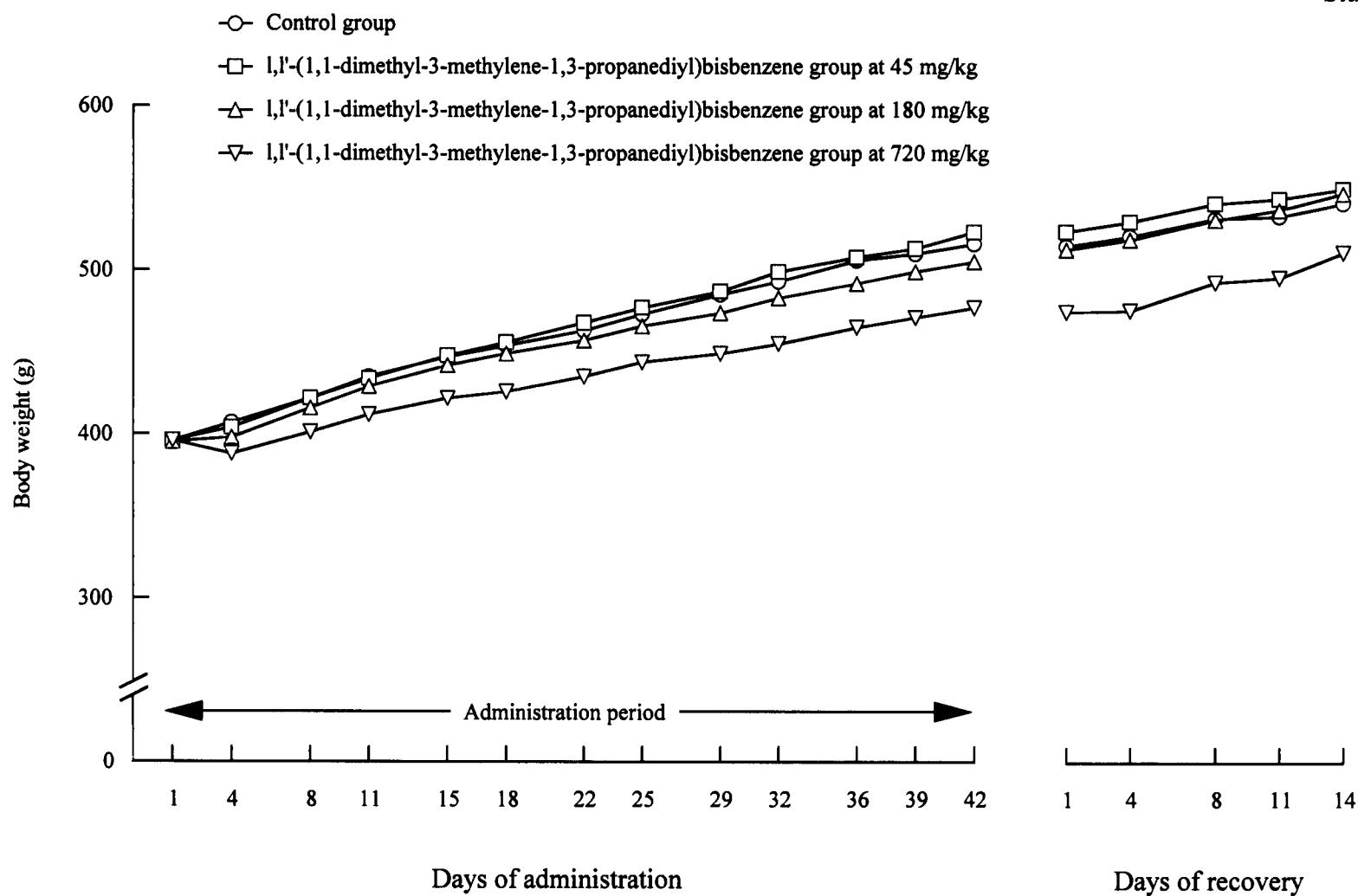


Fig. 2 Body weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of l,l' -(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

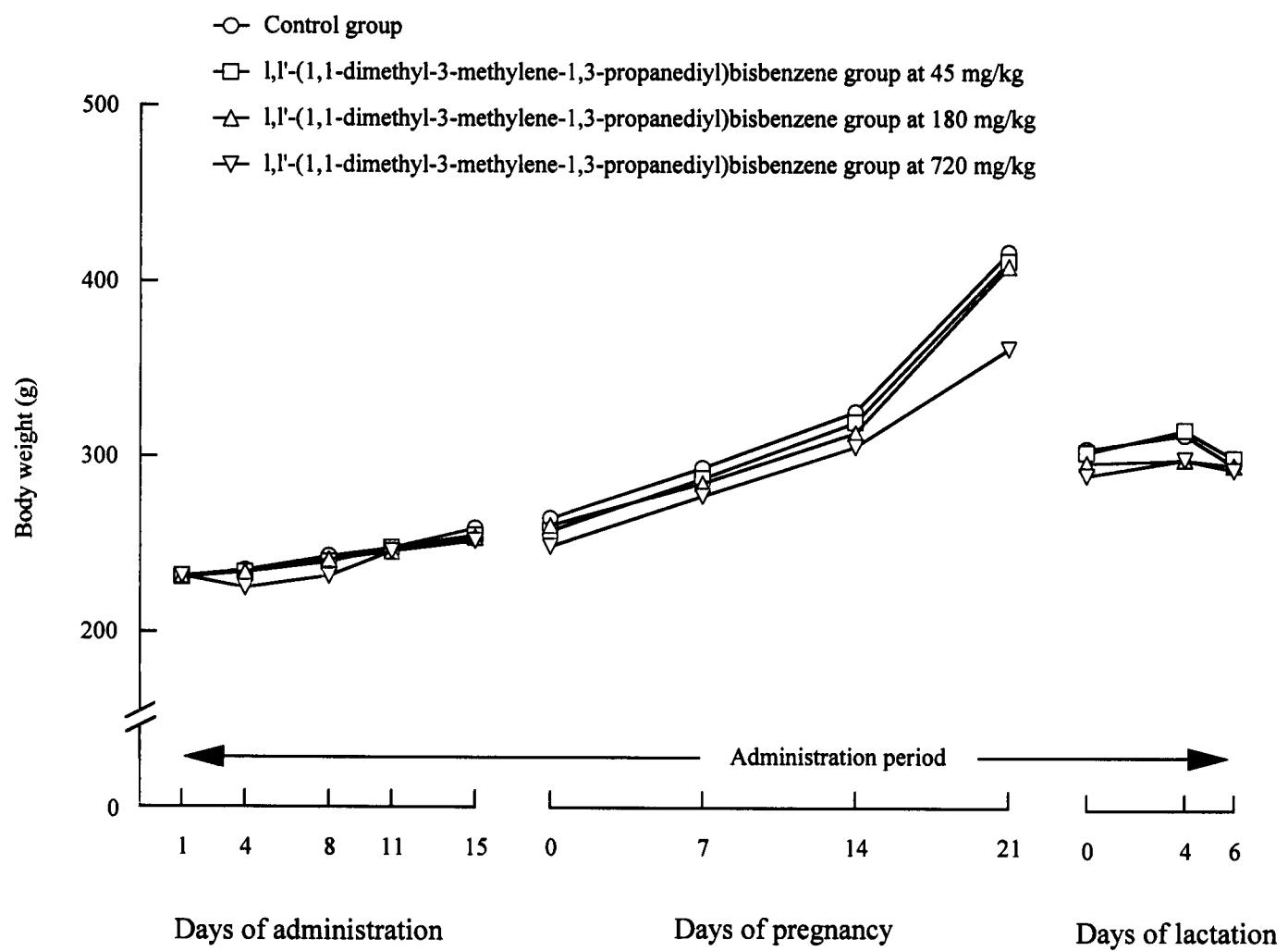


Fig. 3 Body weights of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

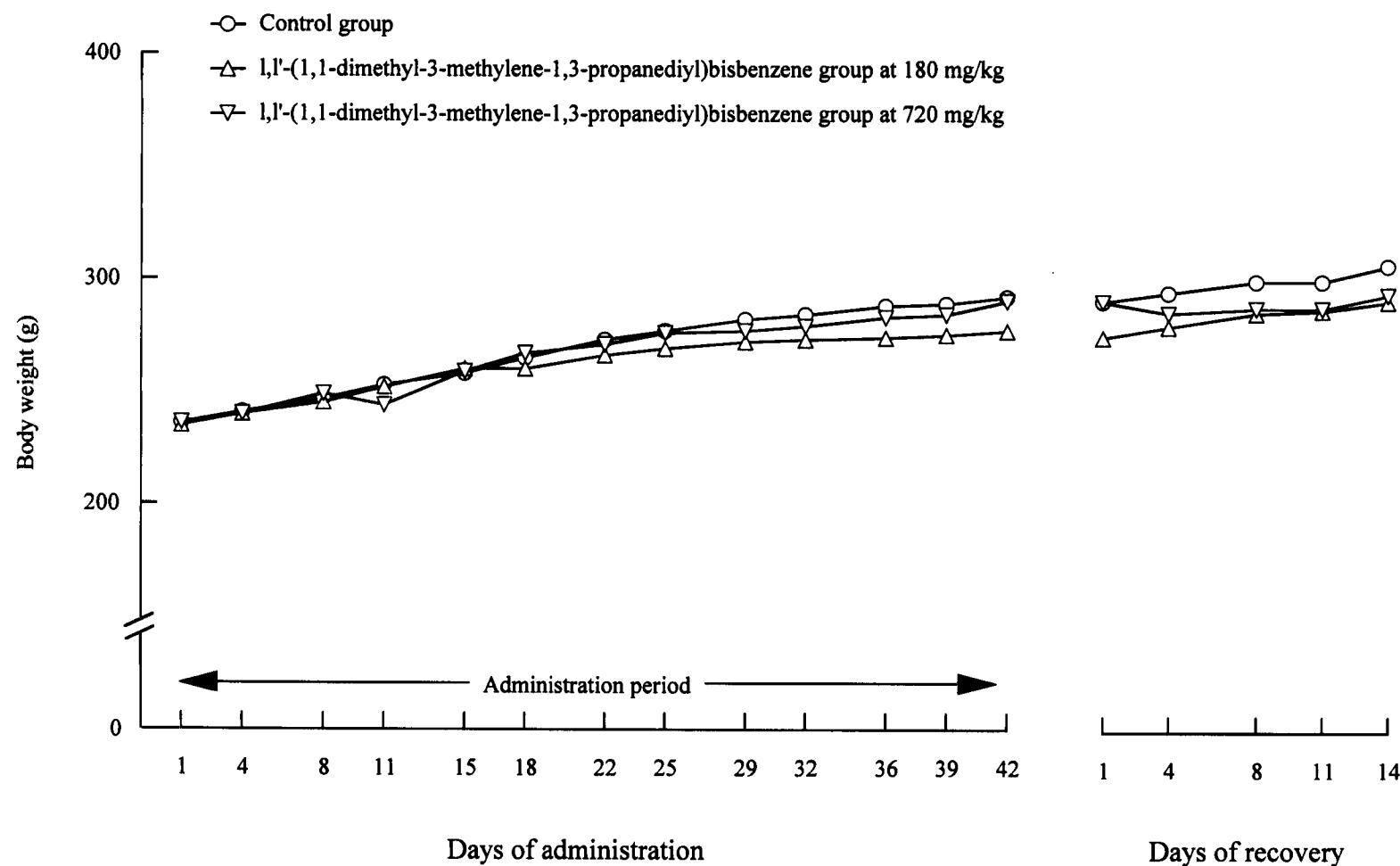


Fig. 4 Body weights of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

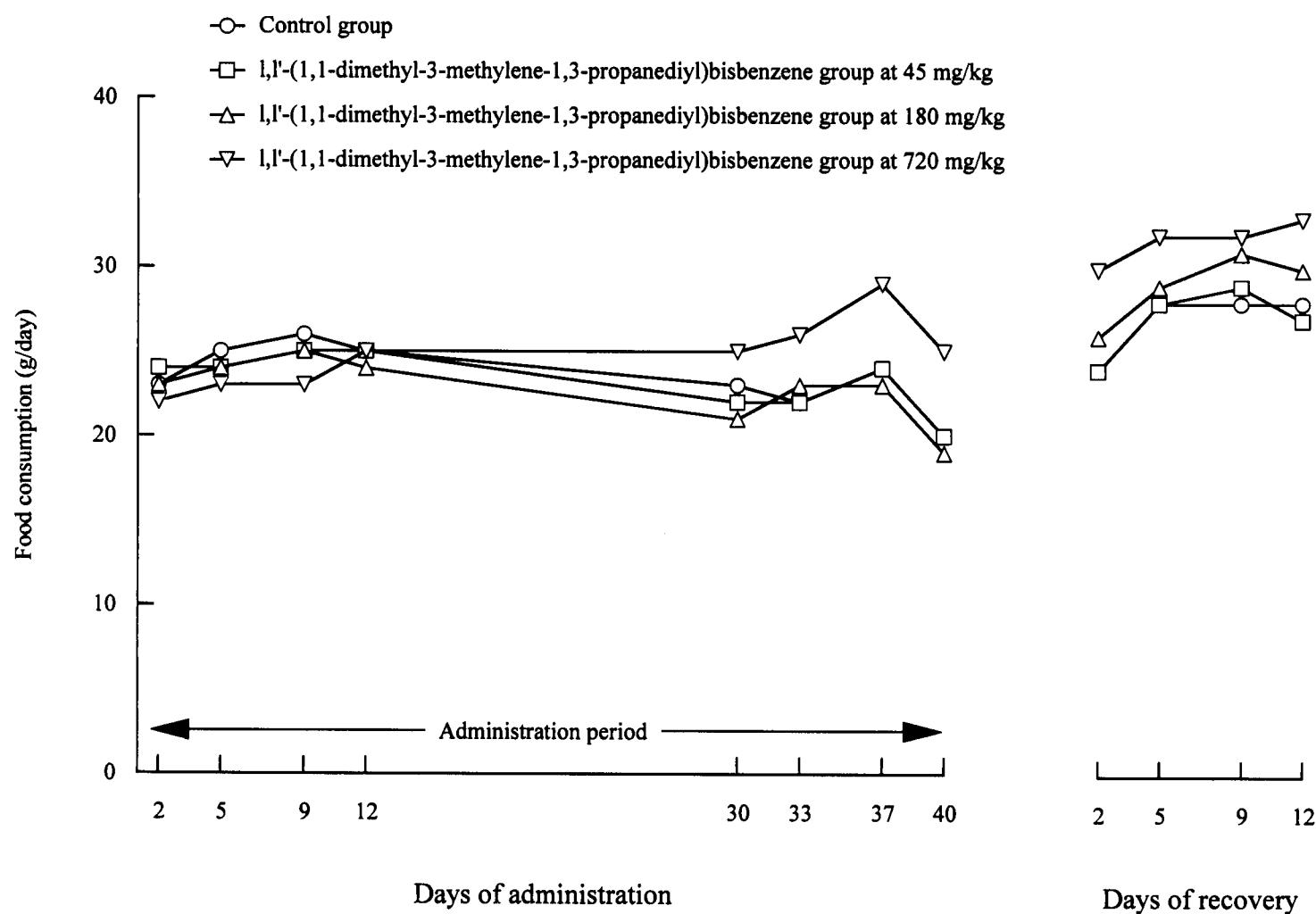


Fig. 5 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of *l,l'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene* by oral administration

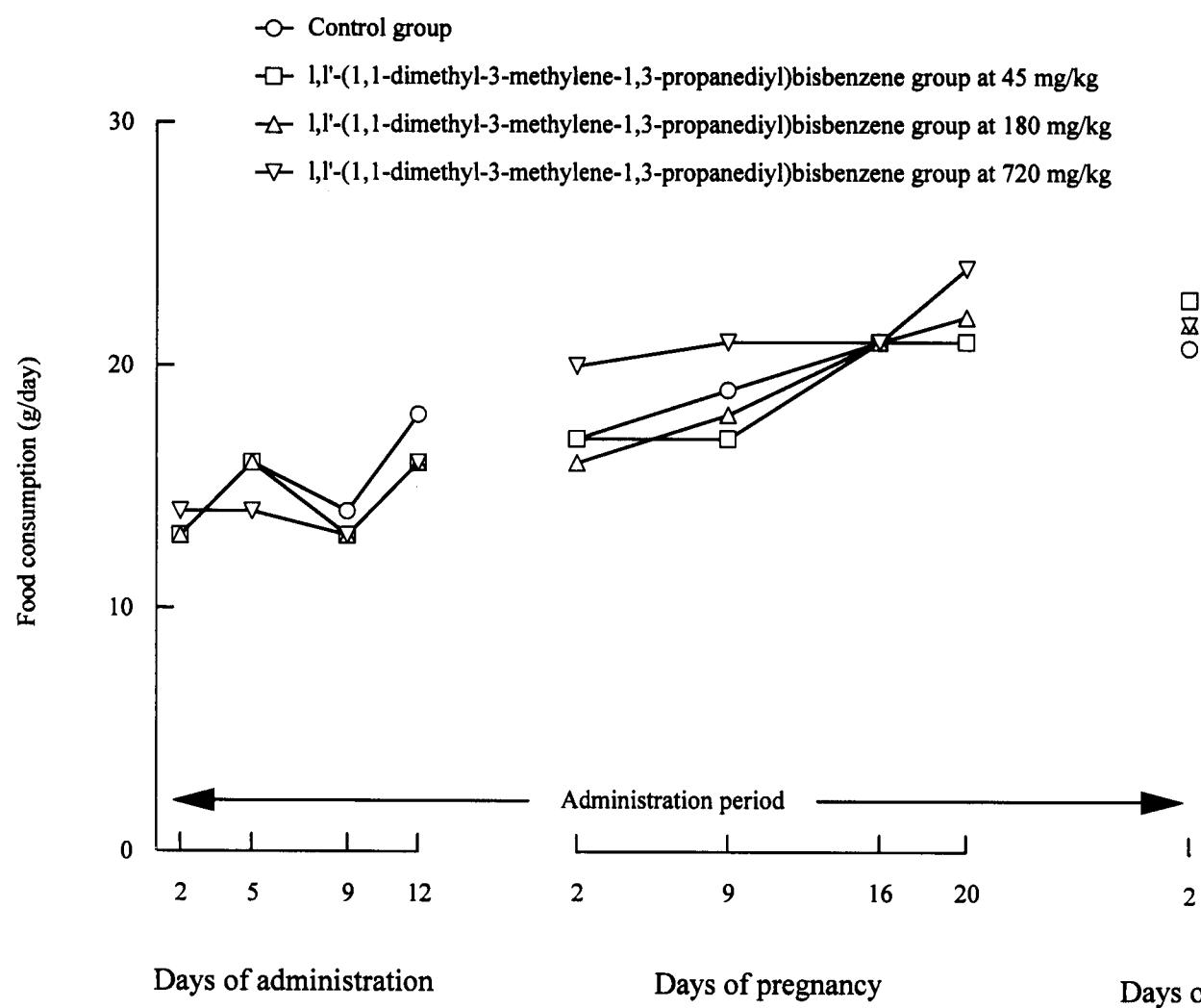


Fig. 6 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

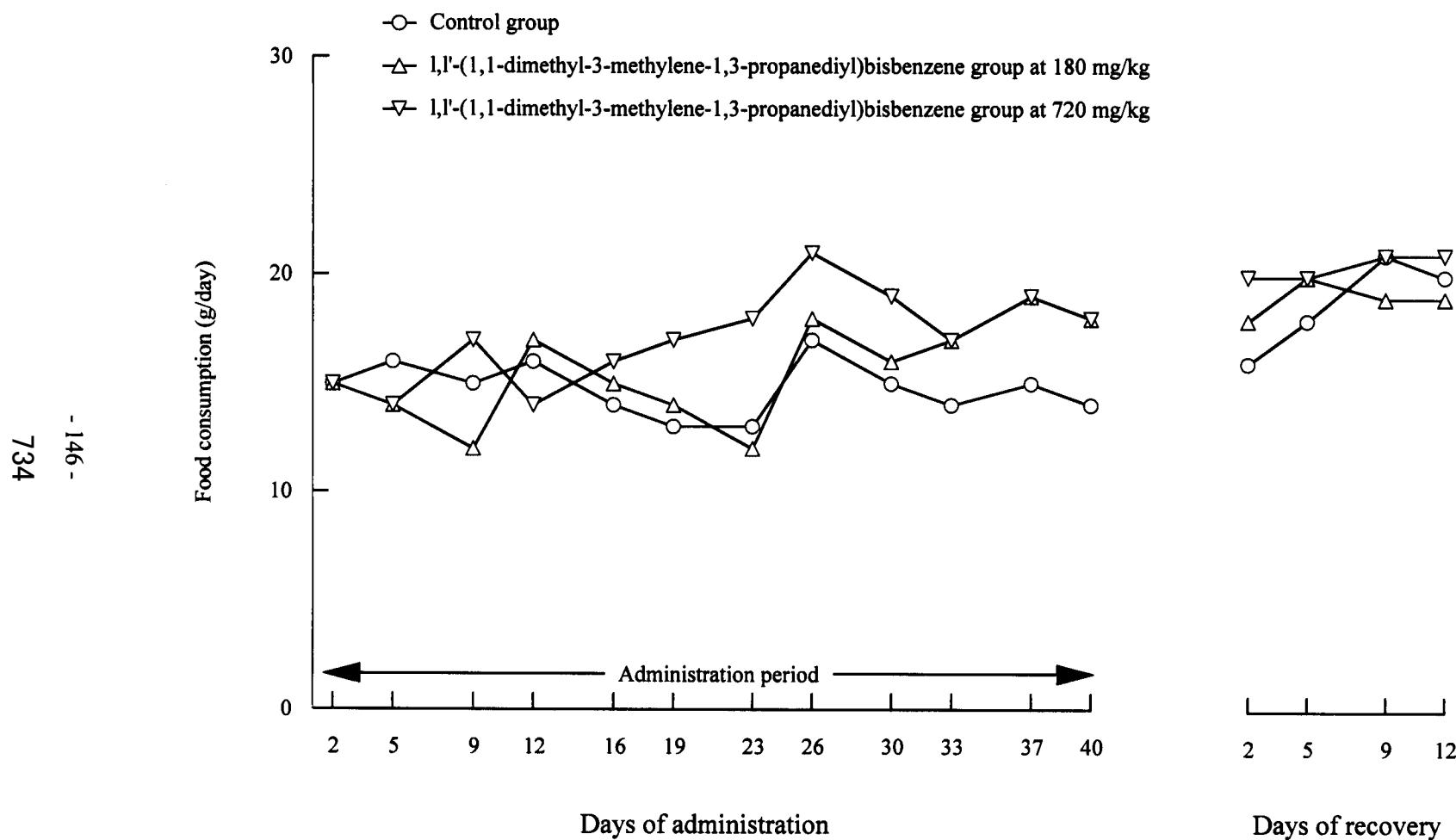


Fig. 7 Food consumption of female rats (recovery group) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene by oral administration

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン		
別 名	1,1-(1,1dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene		
C A S 番 号	6362-80-7		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分 子 量	236.36		
試験に供した新規 化 学 物 質 の 純 度	96.97%		
試験に供した新規 化 学 物 質 の Lot No.	412220		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	2,4-Diphenyl-4-methyl-2-pentene 2.54% 1,1,3-Trimethyl-3-phenylindan 0.24% α-MS 0.07%		
蒸 気 圧	11 Pa (170°C)		
対 水 溶 解 度	10 ppm		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融 点	-82°C		
沸 点	310°C		
常 温 に お け る 性 状	無色透明の液体でスチレン臭		
安 定 性	常温・常圧で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	DMSO	482.4 mg/mL以上*	**
その他	*: 試験施設にて溶解度を確認 **: 482.4 mg/mL DMSO溶液に発熱、発泡は認められず。		

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入 手 年 月 日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1996年 10月 18日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1996年 10月 18日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1995年 2月 25日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1537	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1995年 2月 25日
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1995年 2月 25日

3. S9 mix

(1) S9の入手法等(該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

自 製・購 入 の 别	1.自 製 ②.購 入 (製造元:オリエンタル酵母工業株式会社)
製 造 年 月 日	2004年 10月 1日製造
購 入 の 場 合 の Lot No.	04100107
保 存 溫 度	-80°C

(2) S9の調製方法

使 用 動 物		誘 導 物 質		
種 系 統	ラット, Crj:CD (SD)	名 称	Phenobarbital 5,6-Benzoflavone	(PB) (BF)
性	雄	投 与 方 法	i.p.	
週 令	7 週	投与期間及び投与量 (g / k g 体 重)	1日目 2,3,4日目 3日目	PB 0.03 g/kg PB 0.06 g/kg BF 0.08 g/kg
体 重	210.5 ± 8.8 g			

(3) S9 mixの組成

成 分	S9 mix 1mL中の量	成 分	S9 mix 1mL中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 μmoL
MgCl ₂	8 μmoL	NADH	4 μmoL
KCl	33 μmoL	Na-リン酸緩衝液	100 μmoL
グルコース-6-リン酸	5 μmoL	その他(注射用水)	0.9 mL

4. 被験物質溶液の調製（被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。）

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	ジメチルスルホキシド	株式会社同仁化学研究所	PU140	紫外外部吸収 スペクトラ用	100.0
溶媒選択の理由	ジメチルスルホキシド(DMSO)は、細菌を用いる復帰突然変異試験で一般的に用いられており、被験物質が容易に溶解するため。				
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	— 時間	一分	−℃	用量設定試験、本試験(I)、本試験(II)とも用時調製	
純度換算の有無	有	(換算計数：)	(無)		

5. 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名称	製造元	Lot No.
	OXOID NUTRIENT BROTH No.2	OXOID Ltd.	298714
前 培 養 時 間	9 時間		
培養容器(形状・容量)	形状：L字管 容量：約 40 mL		
培 養 液 量	10 mL	接 種 菌 量	20 μL

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌 株 名	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
生菌数 (×10 ⁹ /mL)	用量設定試験	3.1	4.1	5.2	3.5
	本 試 験 (I)	3.1	4.2	5.2	3.6
	本 試 験 (II)	3.1	4.2	5.2	3.6
測 定 方 法 (いずれかを○で囲むこと。)	① O. D. 値よりの換算 3. その他 ()			2. 段階希釈	

6. 最少グルコース寒天平板培地（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

自 製 ・ 購 入 の 別	1.自 製 ②購 入 (製造元：オリエンタル酵母工業株式会社)
製 造 年 月 日	2004年 11月 16日製造
購 入 の 場 合 の L o t N o .	ANI990KT
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	伊那寒天 BA-30A 伊那食品工業（株） Lot No.40127

7. 試験の方法（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

(1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	① プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他 ()
その他の場合は その選定理由	_____

(2) 試験条件

組 成	菌 懸 濁 液	0.1 mL
	被 験 物 質 溶 液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液（直接法による場合）	0.5 mL
	S9 mix（代謝活性化法による場合）	0.5 mL
	ト ッ プ ア ガ イ	2 mL
	そ の 他 ()	—
プレインキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	約48 時間

8. コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル計測 ②機器計測
補正の有無	1. 無 ②有(補正の方法 面積補正+数え落とし補正)

9. 試験結果

(1) 試験の結果は別表1-1~1-5による。

(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)	陽性	陰性
-----------------------	----	----

判定の理由

本被験物質は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても、復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以上に増加しなかった。

2回実施した本試験には再現性が認められた。

本試験で用いた陽性対照物質は明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は背景データの範囲内にあり、試験条件を満たすものであったことから、試験系に影響した他の要因がなく、試験は適切に実施されたことが確認された。

以上の結果より、本被験物質は陰性と判定した。

(陽性と判定した場合には、別表2比活性の表を添付すること。)

(3) 参考事項

[用量設定理由]

本試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために用量設定試験を実施した。用量設定試験の試験濃度は、「新規化学物質等に係る試験方法について」(平成15年11月21日)に従い、いずれの菌株も5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高濃度として、以下公比4で1250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22及び0.305 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の計8濃度を設定した。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

用量設定試験の結果から本試験(I)及び本試験(II)の濃度は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が4濃度以上含まれるように、以下公比2で6濃度を設定した。すなわち、S9 mix無添加の場合、TA100及びTA1535では9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP2uvrAでは156.3, 312.5, 625, 1250, 2500及び5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA98及びTA1537では2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1及び78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。S9 mix添加の場合、TA100では39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625及び1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA1535及びWP2uvrAでは156.3, 312.5, 625, 1250, 2500及び5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA98では9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA1537では2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1及び78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

(別表 1-1)

試験結果表

被験物質の名称：2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン（用量設定試験）

試験実施期間		2005年 2月 7日 より 2005年 2月 10日				
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{C}$ -レート)	復帰変異数（コロニー数/プレート）				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
-S9 mix	陰性対照	111 (111)	10 (10)	51 (51)	19 (19)	13 (13)
	0.305	136 (136)	17 (17)	48 (48)	17 (17)	3 (3)
	1.22	146 (146)	8 (8)	46 (46)	9 (9)	6 (6)
	4.88	125 (125)	16 (16)	35 (35)	17 (17)	9 (9)
	19.5	118 (118)	13 (13)	47 (47)	20 (20)	13 (13)
	78.1	137 (137)	17 (17)	44 (44)	13* (13)	14* (14)
	312.5	114* (114)	10* (10)	33 (33)	22* (22)	8* (8)
	1250#	126* (126)	13* (13)	49 (49)	16* (16)	7* (7)
	5000#	125* (125)	16* (16)	48* (48)	22* (22)	6* (6)
+S9 mix	陰性対照	146 (146)	9 (9)	41 (41)	29 (29)	20 (20)
	0.305	137 (137)	16 (16)	36 (36)	26 (26)	15 (15)
	1.22	138 (138)	16 (16)	44 (44)	31 (31)	18 (18)
	4.88	154 (154)	14 (14)	49 (49)	32 (32)	19 (19)
	19.5	127 (127)	11 (11)	46 (46)	29 (29)	21 (21)
	78.1	137 (137)	17 (17)	40 (40)	28 (28)	19* (19)
	312.5	139 (139)	7 (7)	42 (42)	17* (17)	20* (20)
	1250	123* (123)	12 (12)	44 (44)	35* (35)	10* (10)
	5000#	137* (137)	12* (12)	36* (36)	27* (27)	4* (4)
陽性 対照	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
	用 量 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{C}$ -レート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/プレート	531 (531)	628 (628)	157 (157)	485 (485)	571 (571)
S9 mixを 必要とす るもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	用 量 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{C}$ -レート)	1	2	10	0.5	2
	コロニー数/プレート	957 (957)	312 (312)	843 (843)	352 (352)	187 (187)

[備考]

- 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
- 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
- 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
- プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
- 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: sodium azide; 9AA: 9-aminoacridine hydrochloride;
2AA: 2-aminoanthracene.

(別表 1-2)

試験結果表

被験物質の名称：2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン（本試験Ⅰ）

試験実施期間		2005年 2月 21日 より					2005年 2月 24日				
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/\text{P}\text{レート}$)	復帰変異数（コロニー数／プレート）									
		塩基対置換型					フレームシフト型				
		TA100	TA1535	WP2uvrA			TA98	TA1537			
-S9 mix	陰性対照	117 118 143 (126±14.7)	12 17 19 (16±3.6)	43 45 46 (45±1.5)			13 19 22 (18±4.6)	13 14 20 (16±3.8)			
	2.44						16 21 27 (21±5.5)	17 19 24 (20±3.6)			
	4.88						20 25 28 (24±4.0)	19 25 28 (24±4.6)			
	9.77	97 104 111 (104±7.0)	15 18 24 (19±4.6)				16 20 20 (19±2.3)	16 20 23 (20±3.5)			
	19.5	114 116 130 (120±8.7)	20 20 25 (22±2.9)				17 19 19 (18±1.2)	18 20 29 (22±5.9)			
	39.1	100 100 103 (101±1.7)	13 13 17 (14±2.3)				20* 21* 21* (21±0.6)	21* 22* 23* (22±1.0)			
	78.1	97 105 118 (107±10.6)	12 14 18 (15±3.1)				15* 19* 27* (20±6.1)	15* 17* 24* (19±4.7)			
	156.3	88* 101* 104* (98±8.5)	11* 16* 19* (15±4.0)	44 50 60 (51±8.1)							
	312.5	90* 109* 109* (103±11.0)	15* 16* 17* (16±1.0)	39 47 51 (46±6.1)							
	625			37 51 54 (47±9.1)							
	1250#			54 58 67 (60±6.7)							
	2500#			38 41 44 (41±3.0)							
	5000#			46* 55* 61* (54±7.5)							
陽性 対照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2					
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{P}\text{レート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1					
		コロニー数/ $\text{P}\text{レート}$	470 544 548 (521±43.9)	578 604 614 (599±18.6)	165 168 171 (168±3.0)	401 425 441 (422±20.1)	339 393 481 (404±71.7)				
	S9 mixを 必要とす るもの	名 称									
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{P}\text{レート}$)									
		コロニー数/ $\text{P}\text{レート}$									

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: sodium azide; 9AA: 9-aminoacridine hydrochloride.

(別表 1-3)

試験結果表

被験物質の名称：2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン（本試験I）

試験実施期間		2005年 2月 21日 より					2005年 2月 24日				
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/\text{P}\text{レート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)									
		塩基対置換型					フレームシフト型				
		TA100	TA1535	WP2uvrA			TA98	TA1537			
+S9 mix	陰性対照	123 130 145 (133±11.2)	16 17 19 (17±1.5)	34 42 60 (45±13.3)			29 36 41 (35±6.0)	20 21 21 (21±0.6)			
	2.44								21 33 36 (30±7.9)		
	4.88								28 33 38 (33±5.0)		
	9.77						25 37 44 (35±9.6)	24 29 32 (28±4.0)			
	19.5						22 26 27 (25±2.6)	24 30 32 (29±4.2)			
	39.1	108 126 131 (122±12.1)					36 36 42 (38±3.5)	25 26 29 (27±2.1)			
	78.1	122 123 128 (124±3.2)					35 36 41 (37±3.2)	30* 32* 33* (32±1.5)			
	156.3	118 124 124 (122±3.5)	13 18 20 (17±3.6)	43 51 53 (49±5.3)			29 30 41 (33±6.7)				
	312.5	101 111 114 (109±6.8)	9 10 14 (11±2.6)	41 46 51 (46±5.0)			19* 26* 35* (27±8.0)				
	625	98* 101* 114* (104±8.5)	18 18 21 (19±1.7)	28 37 58 (41±15.4)							
	1250	82* 86* 97* (88±7.8)	7 13 18 (13±5.5)	42 45 54 (47±6.2)							
	2500#		14* 22* 27* (21±6.6)	51 56 57 (55±3.2)							
	5000#		15* 17* 19* (17±2.0)	42* 53* 69* (55±13.6)							
陽性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称 用量 ($\mu\text{g}/\text{P}\text{レート}$) コロニー数/ $\text{P}\text{レート}$									
	S9 mixを 必要とす るもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA			
		用量 ($\mu\text{g}/\text{P}\text{レート}$)	1	2	10	0.5	2				
		コロニー数/ $\text{P}\text{レート}$	748 777 835 (787±44.3)	303 330 367 (333±32.1)	746 759 924 (810±99.2)	364 381 385 (377±11.2)	134 142 165 (147±16.1)				

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

2AA: 2-Aminoanthracene.

(別表1-4)

試験結果表

被験物質の名称：2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン（本試験II）

試験実施期間		2005年 2月 28日 より						2005年 3月 3日			
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数（コロニー数／プレート）									
		塩基対置換型						フレームシフト型			
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
-S9 mix	陰性対照	119 (121±2.9)	119 (12±1.0)	124 (48±6.0)	11 (12±1.0)	12 (49±5.4)	13 (54±6.0)	20 (21±0.6)	21 (21±0.6)	21 (10±4.6)	
	2.44							12 (16±3.8)	18 (18±3.8)	19 (20±2.5)	
	4.88							17 (23±6.5)	23 (26±6.5)	30 (28±1.5)	
	9.77	106 (113±7.0)	114 (113±7.0)	120 (113±7.0)	14 (16±2.5)	16 (19±2.5)	19 (19±2.5)	21 (21±2.5)	24 (21±2.5)	24 (18±3.1)	
	19.5	126 (128±2.1)	127 (128±2.1)	130 (128±2.1)	13 (14±1.7)	13 (16±1.7)	16 (16±4.6)	22 (21±4.6)	25 (21±4.6)	21 (17±2.1)	
	39.1	118 (130±10.7)	136 (130±10.7)	137 (130±10.7)	12 (15±3.6)	14 (15±3.6)	19 (19±2.5)	22* (22±2.5)	25* (22±2.5)	27* (22±3.8)	
	78.1	118 (120±2.0)	120 (120±2.0)	122 (120±2.0)	10 (14±3.5)	14 (14±3.5)	17 (17±3.5)	18* (18±3.5)	21* (21±3.5)	25* (21±3.5)	
	156.3	119* (127±7.5)	128* (127±7.5)	134* (127±7.5)	11* (13±2.1)	12* (13±2.1)	15* (15±2.1)	50 (58±7.0)	61 (63±7.0)	63 (58±7.0)	
	312.5	97* (108±10.5)	109* (108±10.5)	118* (108±10.5)	9* (11±1.5)	11* (11±1.5)	12* (12±1.5)	47 (53±5.3)	55 (53±5.3)	57 (53±5.3)	
	625							51 (59±6.9)	63 (59±6.9)	63 (59±6.9)	
	1250#							53 (63±9.5)	64 (63±9.5)	72 (63±9.5)	
	2500#							62 (69±7.0)	69 (69±7.0)	76 (69±7.0)	
	5000#							56* (59±3.1)	58* (59±3.1)	62* (59±3.1)	
陽性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	AF-2			9AA	
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	0.1			80	
		コロニー数/ プレート	539 (561±29.9)	549 (604±16.5)	595 (621±11.0)	153 (169±11.0)	169 (174±11.0)	174 (174±11.0)	377 (408±44.7)	387 (408±44.7)	459 (431±52.6)
	S9 mixを 必要とす るもの	名 称									
		用 量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)									
		コロニー数/ プレート									

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: sodium azide; 9AA: 9-aminoacridine hydrochloride.

(別表 1-5)

試験結果表

被験物質の名称：2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン（本試験II）

試験実施期間		2005年 2月 28日 より					2005年 3月 3日		
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/\text{P}^{\circ}\text{レート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)							
		塩基対置換型			フレームシフト型				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537			
+S9 mix	陰性対照	107 116 140 (121±17.1)	10 12 13 (12±1.5)	48 50 52 (50±2.0)	30 37 38 (35±4.4)	20 20 27 (22±4.0)			
	2.44						26 31 32 (30±3.2)		
	4.88						23 33 35 (30±6.4)		
	9.77					29 31 32 (31±1.5)	25 30 37 (31±6.0)		
	19.5					28 32 37 (32±4.5)	32 34 41 (36±4.7)		
	39.1	144 155 164 (154±10.0)				33 35 42 (37±4.7)	25 28 36 (30±5.7)		
	78.1	128 151 159 (146±16.1)				35 39 39 (38±2.3)	31* 34* 37* (34±3.0)		
	156.3	115 136 141 (131±13.8)	8 12 19 (13±5.6)	47 53 61 (54±7.0)	29 38 40 (36±5.9)				
	312.5	123 131 142 (132±9.5)	8 10 11 (10±1.5)	60 64 67 (64±3.5)	25* 38* 38* (34±7.5)				
	625	109* 137* 151* (132±21.4)	9 10 12 (10±1.5)	50 56 60 (55±5.0)					
	1250	116* 124* 137* (126±10.6)	7 9 16 (11±4.7)	45 51 61 (52±8.1)					
	2500#		10* 11* 11* (11±0.6)	34 46 47 (42±7.2)					
	5000#		7* 10* 12* (10±2.5)	48* 56* 59* (54±5.7)					
陽性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称 用量 ($\mu\text{g}/\text{P}^{\circ}\text{レート}$) コロニー数/ $\text{P}^{\circ}\text{レート}$							
	S9 mixを 必要とす るもの	名 称 用量 ($\mu\text{g}/\text{P}^{\circ}\text{レート}$) コロニー数/ $\text{P}^{\circ}\text{レート}$	2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2		
			818 903 914 (878±52.5)	297 317 338 (317±20.5)	822 832 910 (855±48.2)	375 376 399 (383±13.6)	147 153 162 (154±7.5)		

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

2AA: 2-Aminoanthracene.

被験物質名 : 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン (CAS No.6362-80-7)

試験系 : *Salmonella typhimurium* : TA100, TA98, TA1535, TA1537

Escherichia coli : WP2uvrA

試験委託者 : 厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設 : 株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的 : 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの細菌を用いる復帰突然変異試験を行い、その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した。

準拠したガイドライン :

「OECD化学品テストガイドライン、471細菌を用いる復帰突然変異試験」(1997年7月21日採択)並びに平成15年11月21日付(薬食発第1121002号:厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・13製局第2号:経済産業省製造産業局長、環保企発第031121002号:環境省総合環境政策局長連名通知)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守したGLP : 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

試験開始日 : 2005年 1月 31日

試験終了日 : 2006年 11月 13日

試験実施日 : 用量設定試験

菌株の前培養実施日 (実験開始日)	2005年 2月 7日
-------------------	-------------

試験の実施日	2005年 2月 8日
--------	-------------

判定日	2005年 2月 10日
-----	--------------

本試験(I)

菌株の前培養実施日	2005年 2月 21日
-----------	--------------

試験の実施日	2005年 2月 22日
--------	--------------

判定日	2005年 2月 24日
-----	--------------

要 約

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium*のTA100, TA98, TA1535及びTA1537並びに*Escherichia coli*のWP2uvrAを用い、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験により検討した。試験は、S9 mix無添加とS9 mix添加の場合について実施した。

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの2.44～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 濃度における復帰変異コロニー数は、本試験(I)及び本試験(II)において、いずれの菌株ともS9 mix無添加及びS9 mix添加の場合にかかわらず、陰性対照の2倍未満であった。陽性対照物質は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれにおいても、明らかな陽性結果を示した。本試験(I)及び本試験(II)の結果には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

Table 1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in bacteria
(dose-finding test)

With(+) or without(-) S9 mix	Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	111	10	51	19	13
	0.305	136	17	48	17	3
	1.22	146	8	46	9	6
	4.88	125	16	35	17	9
	19.5	118	13	47	20	13
	78.1	137	17	44	13*	14*
	312.5	114*	10*	33	22*	8*
	1250#	126*	13*	49	16*	7*
	5000#	125*	16*	48*	22*	6*
S9 mix (+)	Negative control	146	9	41	29	20
	0.305	137	16	36	26	15
	1.22	138	16	44	31	18
	4.88	154	14	49	32	19
	19.5	127	11	46	29	21
	78.1	137	17	40	28	19*
	312.5	139	7	42	17*	20*
	1250	123*	12	44	35*	10*
	5000##	137*	12*	36*	27*	4*
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	531	628	157	485	571
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA				
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	957	312	843	352	187

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide; NaN_3 : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride;

2AA : 2-aminoanthracene.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: Clear oily precipitations were observed on the surface of agar plate.

#: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in bacteria
(mutagenicity test I : -S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Negative control	117 , 118 , 143 (126±14.7)	12 , 17 , 19 (16±3.6)	43 , 45 , 46 (45±1.5)	13 , 19 , 22 (18±4.6)	13 , 14 , 20 (16±3.8)
2.44				16 , 21 , 27 (21±5.5)	17 , 19 , 24 (20±3.6)
4.88				20 , 25 , 28 (24±4.0)	19 , 25 , 28 (24±4.6)
9.77	97 , 104 , 111 (104±7.0)	15 , 18 , 24 (19±4.6)		16 , 20 , 20 (19±2.3)	16 , 20 , 23 (20±3.5)
19.5	114 , 116 , 130 (120±8.7)	20 , 20 , 25 (22±2.9)		17 , 19 , 19 (18±1.2)	18 , 20 , 29 (22±5.9)
39.1	100 , 100 , 103 (101±1.7)	13 , 13 , 17 (14±2.3)		20*, 21*, 21* (21±0.6)	21*, 22*, 23* (22±1.0)
78.1	97 , 105 , 118 (107±10.6)	12 , 14 , 18 (15±3.1)		15*, 19*, 27* (20±6.1)	15*, 17*, 24* (19±4.7)
156.3	88*, 101*, 104* (98±8.5)	11*, 16*, 19* (15±4.0)	44 , 50 , 60 (51±8.1)		
312.5	90*, 109*, 109* (103±11.0)	15*, 16*, 17* (16±1.0)	39 , 47 , 51 (46±6.1)		
625			37 , 51 , 54 (47±9.1)		
1250#			54 , 58 , 67 (60±6.7)		
2500#			38 , 41 , 44 (41±3.0)		
5000#			46*, 55*, 61* (54±7.5)		
Positive control					
Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
Number of colonies/plate	470 , 544 , 548 (521±43.9)	578 , 604 , 614 (599±18.6)	165 , 168 , 171 (168±3.0)	401 , 425 , 441 (422±20.1)	339 , 393 , 481 (404±71.7)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3 : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride.

() : Mean±S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: Clear oily precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-2. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in bacteria
(mutagenicity test I : +S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Negative control	123 , 130 , 145 (133±11.2)	16 , 17 , 19 (17±1.5)	34 , 42 , 60 (45±13.3)	29 , 36 , 41 (35±6.0)	20 , 21 , 21 (21±0.6)
2.44					21 , 33 , 36 (30±7.9)
4.88					28 , 33 , 38 (33±5.0)
9.77				25 , 37 , 44 (35±9.6)	24 , 29 , 32 (28±4.0)
19.5				22 , 26 , 27 (25±2.6)	24 , 30 , 32 (29±4.2)
39.1	108 , 126 , 131 (122±12.1)			36 , 36 , 42 (38±3.5)	25 , 26 , 29 (27±2.1)
78.1	122 , 123 , 128 (124±3.2)			35 , 36 , 41 (37±3.2)	30*, 32*, 33* (32±1.5)
156.3	118 , 124 , 124 (122±3.5)	13 , 18 , 20 (17±3.6)	43 , 51 , 53 (49±5.3)	29 , 30 , 41 (33±6.7)	
312.5	101 , 111 , 114 (109±6.8)	9 , 10 , 14 (11±2.6)	41 , 46 , 51 (46±5.0)	19*, 26*, 35* (27±8.0)	
625	98*, 101*, 114* (104±8.5)	18 , 18 , 21 (19±1.7)	28 , 37 , 58 (41±15.4)		
1250	82*, 86*, 97* (88±7.8)	7 , 13 , 18 (13±5.5)	42 , 45 , 54 (47±6.2)		
2500##		14* , 22* , 27* (21±6.6)	51 , 56 , 57 (55±3.2)		
5000##		15* , 17* , 19* (17±2.0)	42* , 53* , 69* (55±13.6)		
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	748 , 777 , 835 (787±44.3)	303 , 330 , 367 (333±32.1)	746 , 759 , 924 (810±99.2)	364 , 381 , 385 (377±11.2)	134 , 142 , 165 (147±16.1)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

() : Mean±S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

#: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 3-1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in bacteria
(mutagenicity test II : -S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Negative control	119 , 119 , 124 (121 \pm 2.9)	11 , 12 , 13 (12 \pm 1.0)	42 , 49 , 54 (48 \pm 6.0)	20 , 21 , 21 (21 \pm 0.6)	10 , 16 , 19 (15 \pm 4.6)
2.44				12 , 18 , 19 (16 \pm 3.8)	20 , 22 , 25 (22 \pm 2.5)
4.88				17 , 23 , 30 (23 \pm 6.5)	25 , 26 , 28 (26 \pm 1.5)
9.77	106 , 114 , 120 (113 \pm 7.0)	14 , 16 , 19 (16 \pm 2.5)		19 , 21 , 24 (21 \pm 2.5)	18 , 20 , 24 (21 \pm 3.1)
19.5	126 , 127 , 130 (128 \pm 2.1)	13 , 13 , 16 (14 \pm 1.7)		16 , 22 , 25 (21 \pm 4.6)	17 , 21 , 21 (20 \pm 2.3)
39.1	118 , 136 , 137 (130 \pm 10.7)	12 , 14 , 19 (15 \pm 3.6)		20*, 22*, 25* (22 \pm 2.5)	20*, 21*, 27* (22 \pm 3.8)
78.1	118 , 120 , 122 (120 \pm 2.0)	10 , 14 , 17 (14 \pm 3.5)		18*, 21*, 25* (21 \pm 3.5)	20*, 23*, 27* (23 \pm 3.5)
156.3	119*, 128*, 134* (127 \pm 7.5)	11*, 12*, 15* (13 \pm 2.1)	50 , 61 , 63 (58 \pm 7.0)		
312.5	97*, 109*, 118* (108 \pm 10.5)	9*, 11*, 12* (11 \pm 1.5)	47 , 55 , 57 (53 \pm 5.3)		
625			51 , 63 , 63 (59 \pm 6.9)		
1250#			53 , 64 , 72 (63 \pm 9.5)		
2500#			62 , 69 , 76 (69 \pm 7.0)		
5000#			56*, 58*, 62* (59 \pm 3.1)		
Positive control					
Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
Number of colonies/plate	539 , 549 , 595 (561 \pm 29.9)	588 , 604 , 621 (604 \pm 16.5)	153 , 169 , 174 (165 \pm 11.0)	377 , 387 , 459 (408 \pm 44.7)	377 , 435 , 482 (431 \pm 52.6)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3 : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride.

() : Mean \pm S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: Clear oily precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 3-2. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in bacteria
(mutagenicity test II : +S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Negative control	107 , 116 , 140 (121±17.1)	10 , 12 , 13 (12±1.5)	48 , 50 , 52 (50±2.0)	30 , 37 , 38 (35±4.4)	20 , 20 , 27 (22±4.0)
2.44					26 , 31 , 32 (30±3.2)
4.88					23 , 33 , 35 (30±6.4)
9.77				29 , 31 , 32 (31±1.5)	25 , 30 , 37 (31±6.0)
19.5				28 , 32 , 37 (32±4.5)	32 , 34 , 41 (36±4.7)
39.1	144 , 155 , 164 (154±10.0)			33 , 35 , 42 (37±4.7)	25 , 28 , 36 (30±5.7)
78.1	128 , 151 , 159 (146±16.1)			35 , 39 , 39 (38±2.3)	31*, 34*, 37* (34±3.0)
156.3	115 , 136 , 141 (131±13.8)	8 , 12 , 19 (13±5.6)	47 , 53 , 61 (54±7.0)	29 , 38 , 40 (36±5.9)	
312.5	123 , 131 , 142 (132±9.5)	8 , 10 , 11 (10±1.5)	60 , 64 , 67 (64±3.5)	25*, 38*, 38* (34±7.5)	
625	109*, 137*, 151* (132±21.4)	9 , 10 , 12 (10±1.5)	50 , 56 , 60 (55±5.0)		
1250	116*, 124*, 137* (126±10.6)	7 , 9 , 16 (11±4.7)	45 , 51 , 61 (52±8.1)		
2500##		10*, 11*, 11* (11±0.6)	34 , 46 , 47 (42±7.2)		
5000##		7*, 10*, 12* (10±2.5)	48*, 56*, 59* (54±5.7)		
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	818 , 903 , 914 (878±52.5)	297 , 317 , 338 (317±20.5)	822 , 832 , 910 (855±48.2)	375 , 376 , 399 (383±13.6)	147 , 153 , 162 (154±7.5)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

() : Mean±S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

#: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

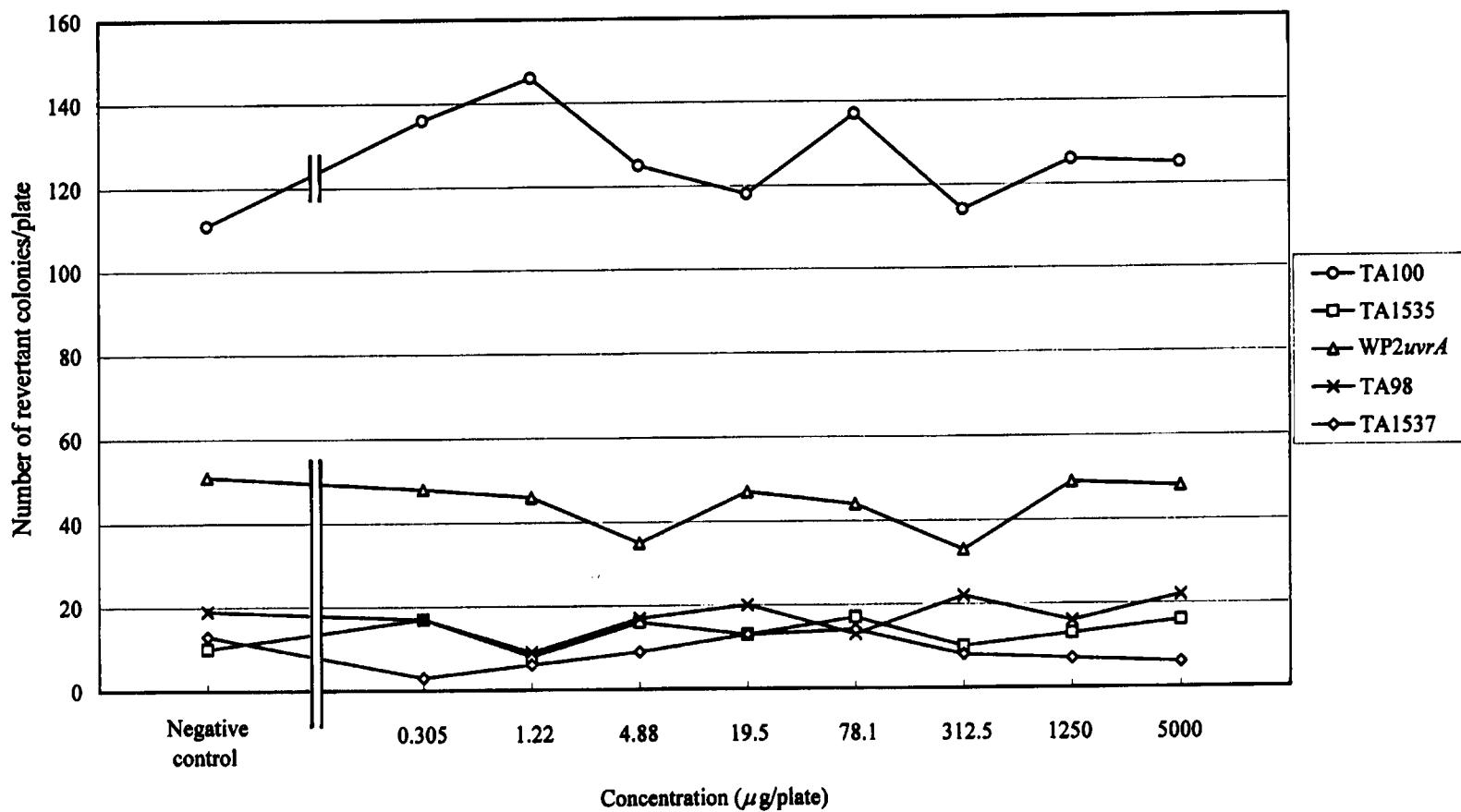


Figure 1-1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria
(dose-finding test: -S9 mix).

Study No. 901824

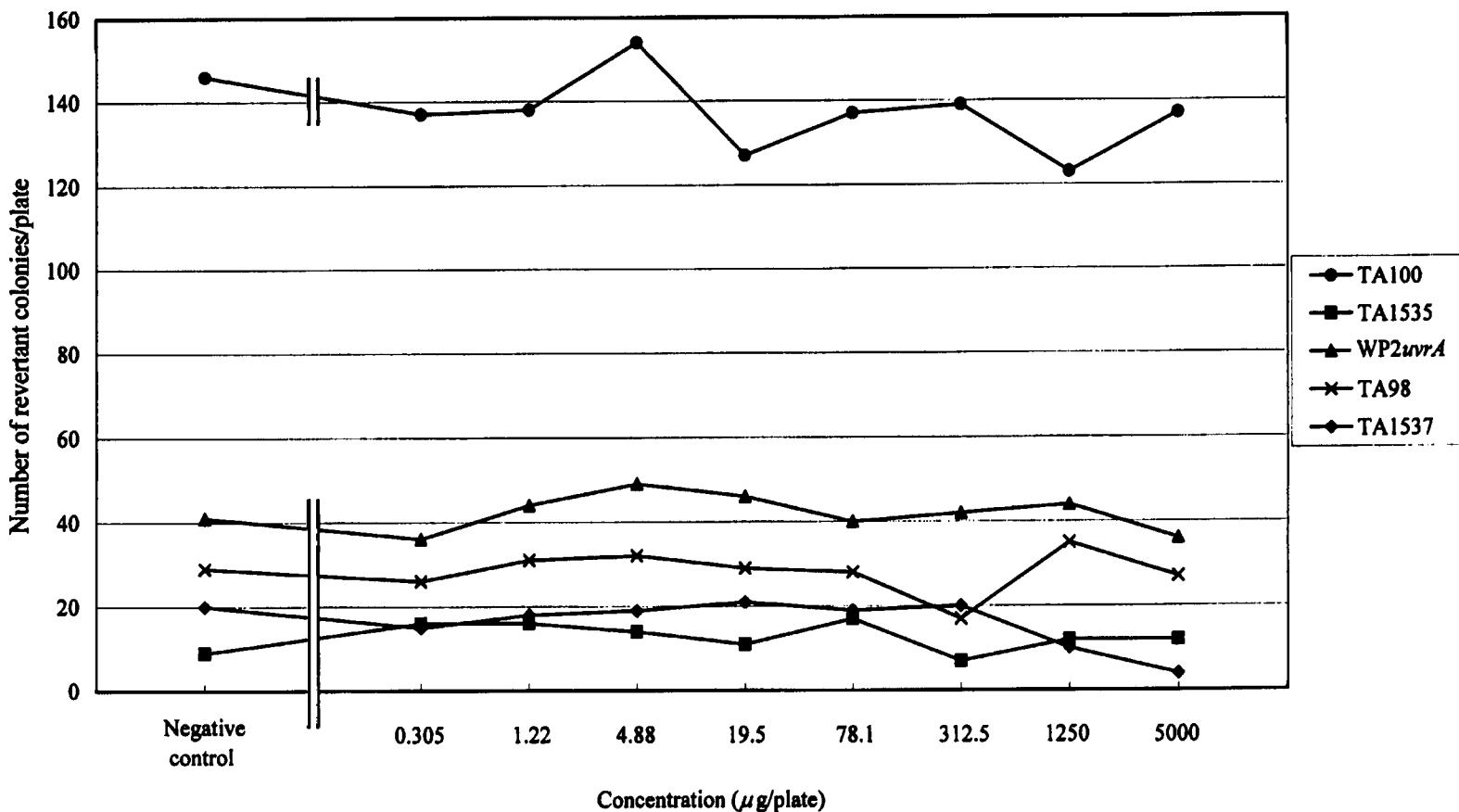


Figure 1-2. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria
(dose-finding test: +S9 mix).

Study No. 901824

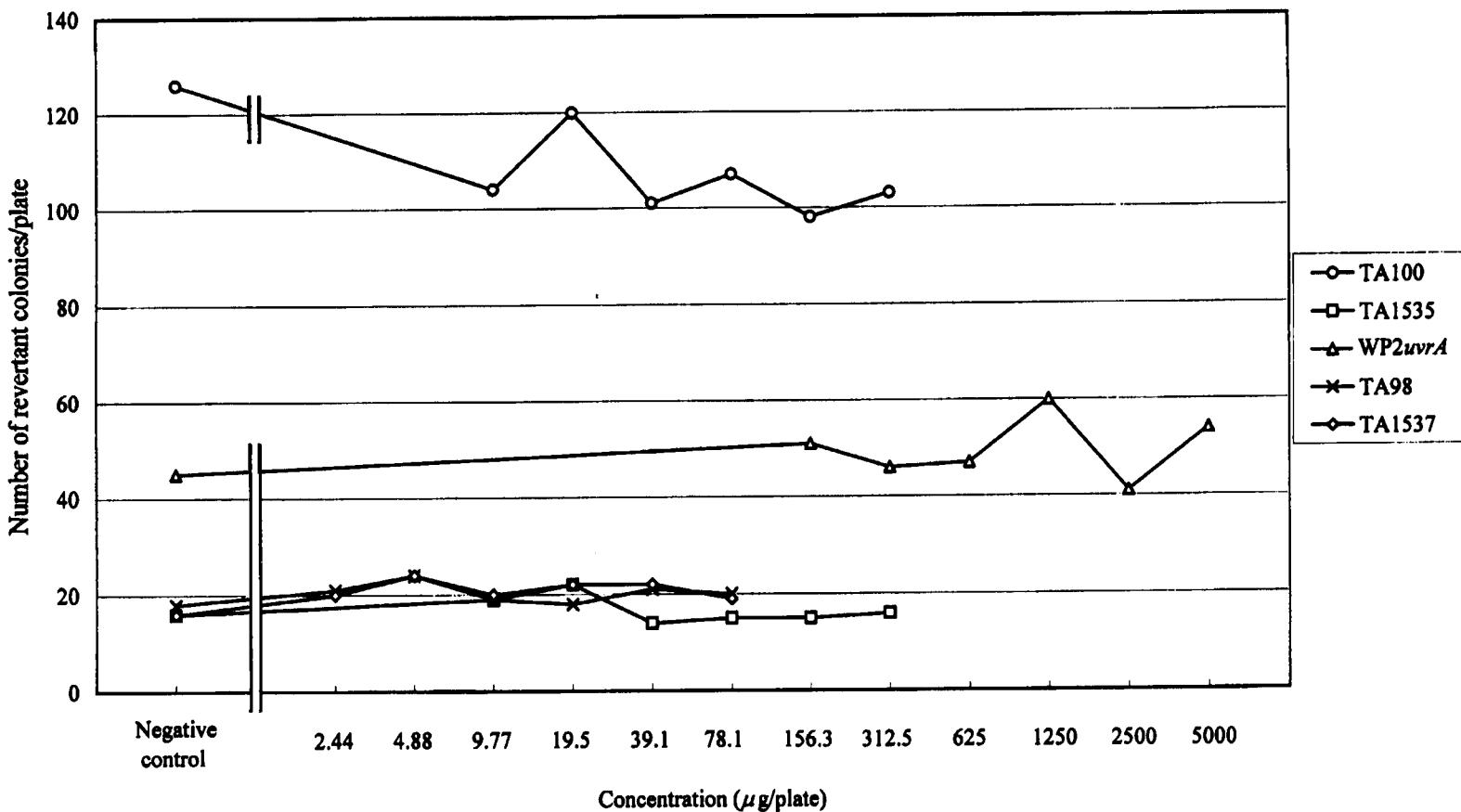


Figure 2-1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria
(mutagenicity test I: -S9 mix).

Study No. 901824

55
-
66

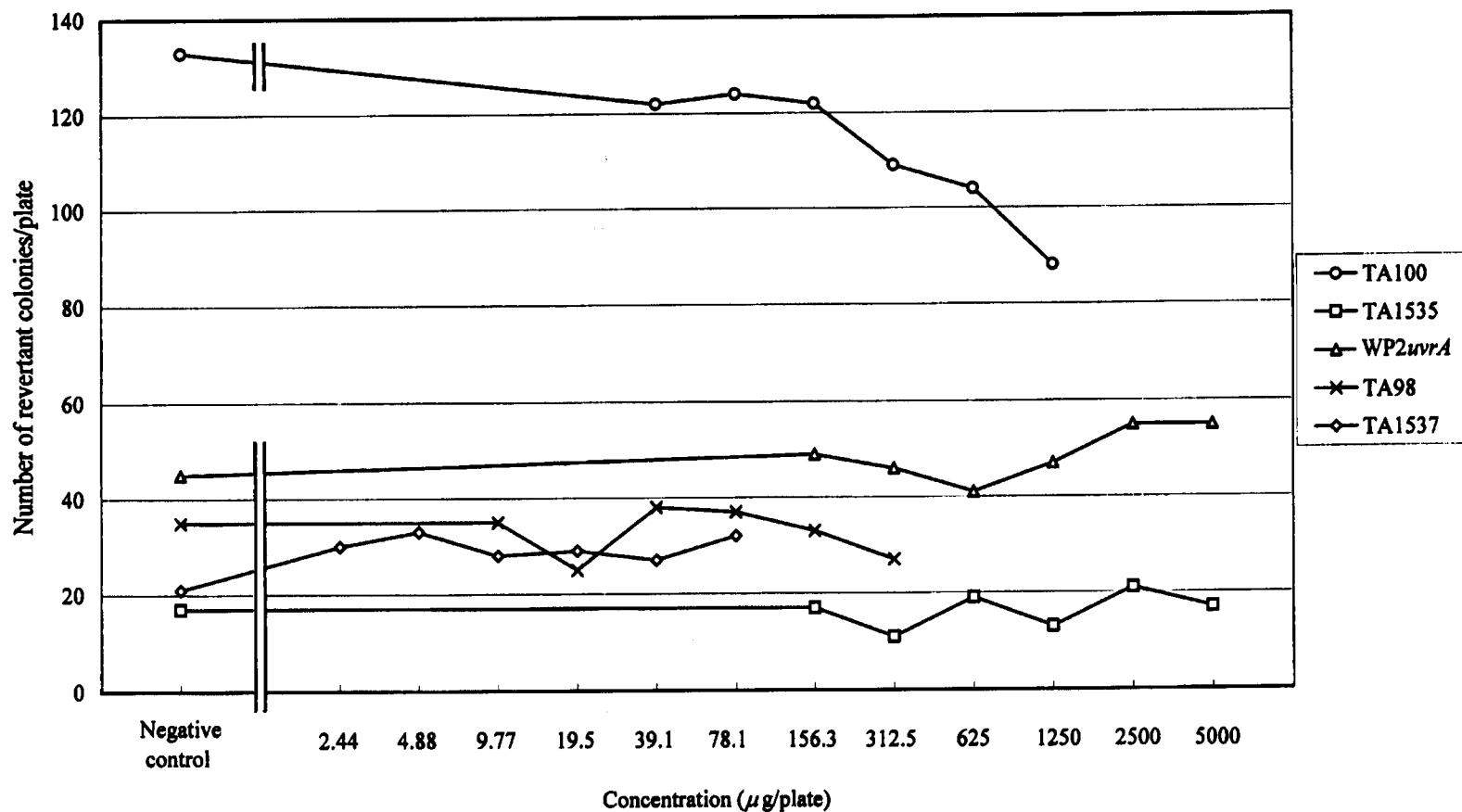


Figure 2-2. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria
(mutagenicity test I: +S9 mix).

Study No. 901824

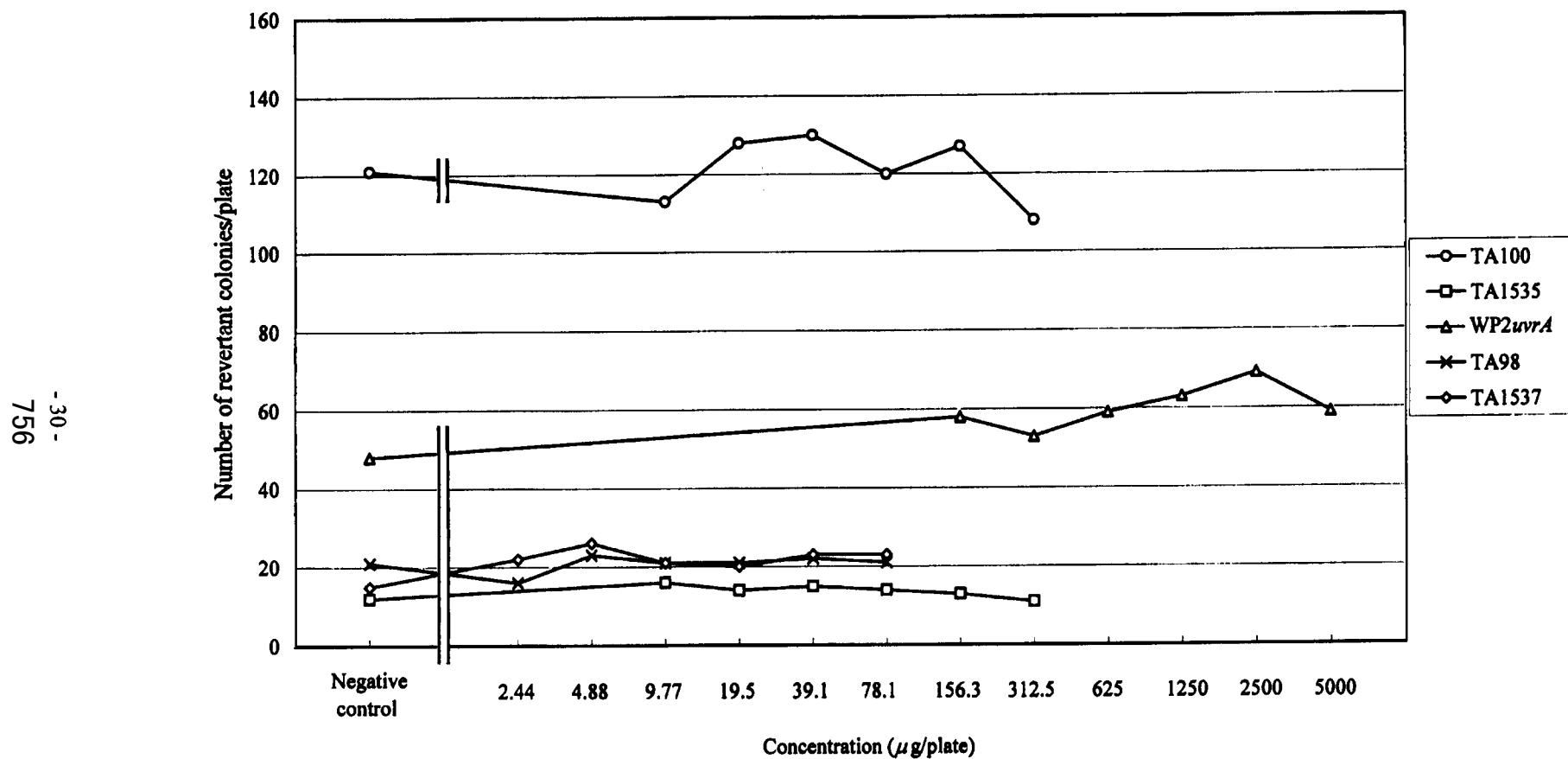


Figure 3-1. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria
(mutagenicity test II: -S9 mix).

Study No. 901824

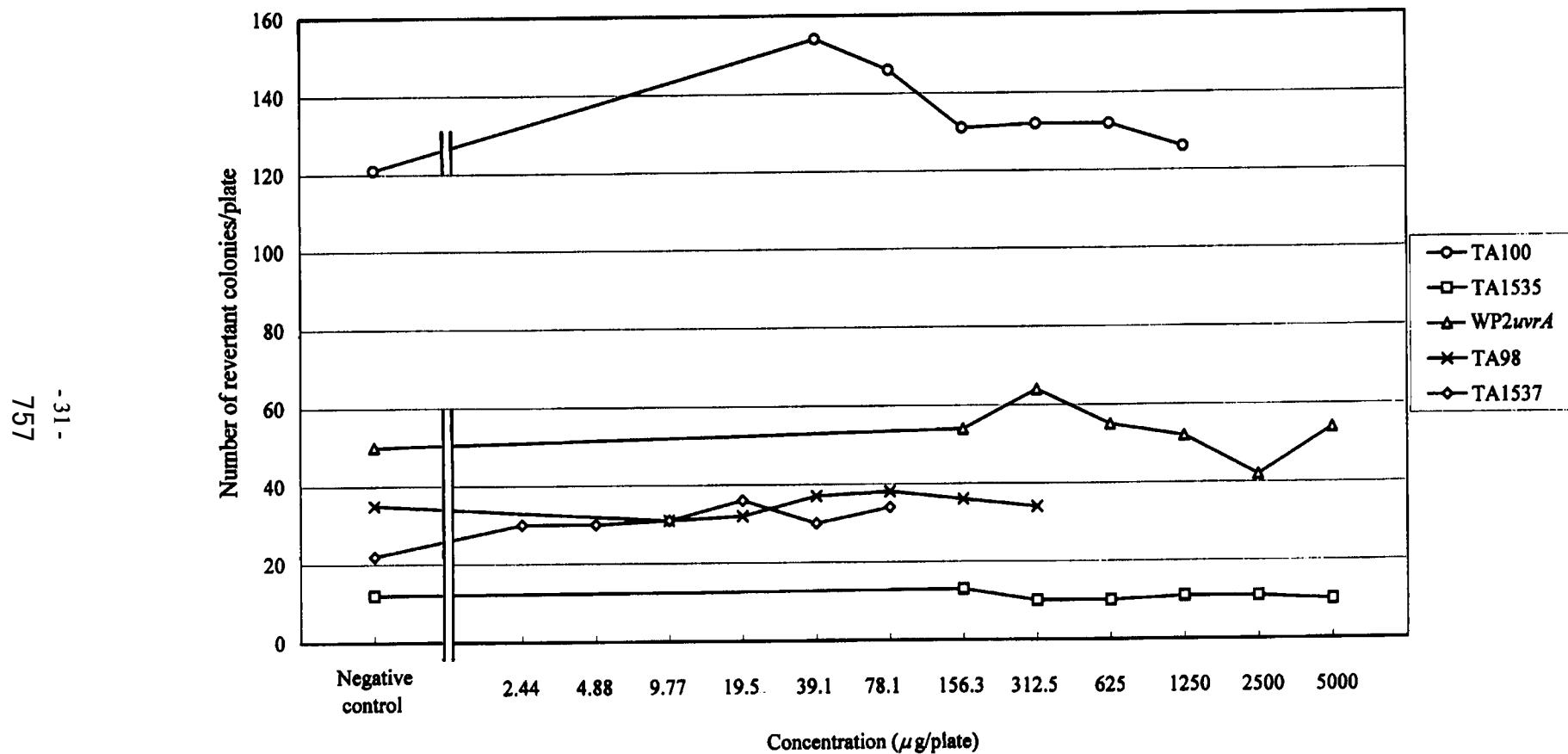


Figure 3-2. Reverse mutation test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in bacteria
(mutagenicity test II: +S9 mix).

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン								
別 名	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene								
C A S 番 号	6362-80-7								
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} $								
分 子 量	236.36								
試験に供した新規 化学物質の純度	96.97 %								
試験に供した新規 化学物質のロット番号	412220								
不純物の名称 及び含有率	<table> <tr> <td>2,4-Diphenyl-4-methyl-2-pentene</td> <td>2.54%</td> </tr> <tr> <td>1,1,3-Trimethyl-3-phenylindan</td> <td>0.24%</td> </tr> <tr> <td>α-MS</td> <td>0.07%</td> </tr> </table>			2,4-Diphenyl-4-methyl-2-pentene	2.54%	1,1,3-Trimethyl-3-phenylindan	0.24%	α -MS	0.07%
2,4-Diphenyl-4-methyl-2-pentene	2.54%								
1,1,3-Trimethyl-3-phenylindan	0.24%								
α -MS	0.07%								
蒸 気 圧	11 Pa (170°C)								
対水溶解度	10 ppm								
1-オクタノール/水分配係数	—								
融 点	-82°C								
沸 点	310°C								
常温における性状	無色透明の液体でスチレン臭								
安 定 性	常温・常圧で安定								
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性						
	DMSO	482.4 mg/mL以上*	**						
備考									
* : 試験施設にて溶解度を確認									
** : 482.4 mg/mL DMSO溶液に発熱、発泡は認められず。									

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 細胞の種類一培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	大日本製薬株式会社 ラボラトリープロダクト部
種	チャイニーズハムスター	入手年月日	2000年 11月 28日
培養液	イーグルのMEM粉末を指定の調製方法に従って溶液とし、メンブランで濾過したもの	製造元	GIBCO
血清の種類と添加量	仔牛 10 %	製造元 (Lot No.)	GIBCO (472959)
細胞周期	16.5 h	凍結条件	-196 °C
継代数	15	容器	プラスチックシャーレ
染色体数 (モード)	25 本	培養条件	温度 37 °C
		C O ₂ 濃度	5 %
備考	—		

3. S9 mix

(1) S9 の入手方法等 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	1.自製 ②購入 (製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2004年 10月 1日製造
購入の場合のLot No.	04100107
保存温度	-80 °C

(2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質		
種・系統	ラット, Crj:CD (SD)	名 称	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)	
性	雄	投与方法	i.p.	
週齢	7週	投与期間及び投与量 (g / kg 体重)	1日目 PB 0.03 g/kg 2.3.4日目 PB 0.06 g/kg 3日目 BF 0.08 g/kg	
体重(匹数)	210.5 ± 8.8 g (63匹)			

(3) S 9 mix の組成

成 分	S 9 mix 1mL中の量	成 分	S 9 mix 1mL中の量
S9	0.3 mL	NADP	4 μmoL
MgCl ₂	5 μmoL	Na-リン酸緩衝液	— μmoL
KCl	33 μmoL	その他 (HEPES緩衝液*)	4 μmoL
グルコース-6-リン酸	5 μmoL	注射用水	総量を1mLとする。

*pH 7.2

(4) S 9 mix の処理条件(該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

① プレート法	2. 浮遊細胞法	3. その他 ()
S 9 量 (最終濃度)	5 %	
S 9 蛋白量 (最終濃度)	1.250 mg/mL	
処理時間	6 h	
回復時間	18 h	
備考	—	

4. 被験物質溶液の調製 (被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。)

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度			
	ジメチルスルホキシド	株式会社同仁化学研究所	PU140	紫外外部吸収 スペクトル用	100.0 %			
溶媒選択の理由	ジメチルスルホキシド(DMSO)は、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で一般的に用いられており、被験物質が容易に溶解するため。							
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他 ()					
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—							
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	— 時間 — 分 — °C 細胞増殖抑制試験、染色体異常試験(短時間処理法、連続処理法)とも用時調製							
純度換算の有無	有				無			

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合		
試験実施期間		2005年 2月 28日から 2005年 3月 1日	2005年 2月 28日から 2005年 3月 1日		
培養器	形 状	円形プラスチックシャーレ			
	大 き さ	直径 60 mm			
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器			
	用量当たりの培養器数	1			
細胞	播種細胞数	2.0×10^4 個/ 5mL			
	前培養日数	3 日間			
処理条件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器			
	S 9 mix 添加量	0.5 mL/培養器			
	S 9 の最終濃度	5 %			
	S 9 蛋白の最終濃度	1.250 mg/mL			
	処理時間	6 h			
	回復時間	18 h			
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤を使用				
備考					

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (6 - 18 h)		代謝活性化法による場合 (6 - 18 h)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.00469	97	0.00469	100
0.00938	97	0.00938	96
0.0188	95	0.0188	94
0.0375	80	0.0375	88
0.075	36	0.075	65
0.150	0	0.150	38
0.300 [†]	0	0.300 [†]	16
0.600 [†]	0	0.600 [†]	0
1.200 [†]	0	1.200 [†]	0
2.400 [†]	0	2.400 [†]	0

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。

[†]代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合とも、0.300 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（油状）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2005年 3月 14日から 2005年 3月 15日	2005年 3月 14日から 2005年 3月 15日
培養器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	2
細胞	播種細胞数	2.0×10^4 個/5mL	2.0×10^4 個/5mL
	前培養日数	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器	0.015 mL/培養器
	S 9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最終濃度		5 %
	S 9 蛋白の最終濃度		1.250 mg/mL
	処理時間	6 h	6 h
	回復時間	18 h	18 h
備考			

(4) 染色体異常試験結果(別表1-1, 1-2による。)

6. 連続処理法による試験

(短時間処理法による試験で陰性と判定された場合に試験を実施すること。)

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		2005年 2月 28日から 2005年 3月 1日	年 月 日から 年 月 日
培養器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培養液量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	
細胞	播種細胞数	2.0×10^4 個/ 5mL	個/ mL
	前培養日数	3 日間	日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処理時間	24 h	h
	回復時間	0 h	h
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24 - 0 h) 処理による場合		(- h) 処理による場合	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100		
0.00469	95		
0.00938	91		
0.0188	68		
0.0375	35		
0.075	0		
0.150	0		
0.300 [†]	0		
0.600 [†]	0		
1.200 [†]	0		
2.400 [†]	0		

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。

[†]0.300 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（油状）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		2005年 3月 17日から 2005年 3月 18日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培 養 液 量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/ 5mL	個/ mL
	前 培 養 日 数	3 日間	日間
処 理 条 件	被 驗 物 質 溶 液 添加 量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	h
	回 復 時 間	0 h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表2による。)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)	陽性	陰性
-----------------------	----	----

判定の理由

本被験物質は、短時間処理法（代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合）及び連続処理法（24時間処理）とも構造異常・数的異常の出現率は5%未満で、用量に伴う増加も認められなかった。

なお、本試験で用いた陽性対照物質は明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、背景データの範囲内にあり、試験条件を満たすものであったことから、試験系に影響した他の要因がなく、試験が適切に実施されたことが確認された。

また、染色体異常試験と同時に実施した細胞増殖抑制試験の結果を再現し、染色体異常試験が適切な濃度で実施されたことを確認した。

以上の結果より、本被験物質は陰性と判断した。

D_{20} 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
		連続処理法		—	h処理	—	mg/mL
				—	h処理	—	mg/mL
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
		連続処理法		—	h処理	—	mg/mL
				—	h処理	—	mg/mL

[備考] D_{20} 値は分裂中期像20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判定した試験系列について、異常のタイプ別に記入すること。

(2) 参考事項

[用量設定理由]

染色体異常試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために細胞増殖抑制試験を実施した。細胞増殖抑制試験の試験濃度は「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成15年11月21日）に基づき、10mMの2.400 mg/mLを最高濃度として、以下公比2で計10濃度を設定した。すなわち、0.00469, 0.00938, 0.0188, 0.0375, 0.075, 0.150, 0.300, 0.600, 1.200及び2.400 mg/mLとした。

細胞増殖抑制試験の結果から、Probit法で求めた被験物質の50 %細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では0.0526 mg/mL、代謝活性化による場合では0.1015 mg/mLであった。一方、連続処理法(24時間処理)では0.0239 mg/mLであった。このことから、染色体異常試験の試験濃度は、 IC_{50} 及び細胞の生存率を指標に、公比2により5段階設定した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では、0.00625, 0.0125, 0.025, 0.050及び0.100 mg/mL、代謝活性化による場合では、0.0125, 0.025, 0.050, 0.100及び0.200 mg/mLとした。連続処理法(24時間処理)では、0.00313, 0.00625, 0.0125, 0.025及び0.050 mg/mLとした。

[被験物質の析出]

被験物質の析出は、短時間処理法及び連続処理法とも、細胞増殖抑制試験では0.300 mg/mL以上の濃度において認められたが、染色体異常試験ではすべての濃度において認められなかった。

[染色体異常の観察及び結果判定の方法]

1シャーレあたり100個、1濃度あたり200個の分裂中期像を観察した。染色体の異常については、数的異常として倍数体及び核内倍化を記録した。また、構造的異常として染色分体切断、染色分体交換、染色体切断、染色体交換及びその他に分類し、これらの異常を1つでも有する細胞を陽性細胞1個として記録した。

結果の判定は、石館の方法を用いて行った。

[備考] 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

別表 1-1

染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称： 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン

処理時間 (hr)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)							ギャップの 出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0			100	1	0	1
			200	0	0	0	0	0	0 (0)			200	1	0	1 (0.5)
6-18	-	0.00625	100	0	0	0	0	0	0	98	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0			100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 (0)			200	0	0	0 (0)
6-18	-	0.0125	100	1	0	0	0	0	1	98	100	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1			100	0	0	0
			200	2	0	0	0	0	2 (1.0)			200	0	0	0 (0)
6-18	-	0.025	100	2	0	0	0	0	2	82	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0			100	1	0	1
			200	2	0	0	0	0	2 (1.0)			200	1	0	1 (0.5)
6-18	-	0.050	100	0	0	0	0	0	0	53	100	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1			100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1 (0.5)			200	0	0	0 (0)
6-18	-	0.100	100	2	0	0	0	0	2	31	100	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1			100	1	0	1
			200	3	0	0	0	0	3 (1.5)			200	1	0	1 (0.5)
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	26	31	0	0	0	46	89	100	100	0	0	0
			100	31	41	0	0	0	59			100	0	0	0
			200	57	72	0	0	0	105 (52.5)			200	0	0	0 (0)

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethyl sulfoxide
 MMC; Mitomycin C

別表 1-2

染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称： 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン

処理時間 (hr)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)							ギャップの 出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	1	0	1
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	2	0	2 (1.0)
6-18	+	0.0125	100	0	0	0	0	0	0	0	98	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	0	0	0 (0)
6-18	+	0.025	100	0	0	0	0	0	0	0	90	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	1	0	1 (0.5)
6-18	+	0.050	100	0	0	0	0	0	0	0	71	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	1	0	1 (0.5)
6-18	+	0.100	100	0	0	0	0	0	0	0	49	100	1	0	1
			100	1	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1
			200	1	1	0	0	0	1 (0.5)	0		200	2	0	2 (1.0)
6-18	+	0.200	100	1	0	0	0	0	1	0	30	100	2	0	2
			100	1	1	0	0	0	2	0		100	0	0	0
			200	2	1	0	0	0	3 (1.5)	0		200	2	0	2 (1.0)
6-18	+	陽性対照 (DMN) 0.500	100	24	48	0	0	0	62	0	83	100	1	0	1
			100	42	59	0	0	0	75	0		100	0	0	0
			200	66	107	0	0	0	137 (68.5)	0		200	1	0	1 (0.5)

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethyl sulfoxide
DMN; Dimethyl nitrosamine

別表2

染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称：2,4ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン

処理時間 (hr)	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数（出現頻度%）							ギャップの 出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度%）			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	0	0	0 (0)
24-0	0.00313	100	0	0	0	0	0	0	0	98	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
		200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	1	0	1 (0.5)
24-0	0.00625	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1
		200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0		200	1	0	1 (0.5)
24-0	0.0125	100	0	0	0	0	0	0	0	82	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	1	0	1 (0.5)
24-0	0.025	100	0	1	0	0	0	1	0	48	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0)
24-0	0.050	100	1	0	0	0	0	1	0	27	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
		200	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0		200	1	0	1 (0.5)
24-0	陽性対照 (MMC) 0.00005	100	23	36	0	0	0	48	0	85	100	0	0	0
		100	24	31	0	0	0	45	0		100	0	0	0
		200	47	67	0	0	0	93 (46.5)	0		200	0	0	0 (0)

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethyl sulfoxide
 MMC; Mitomycin C

図1 細胞増殖抑制試験結果

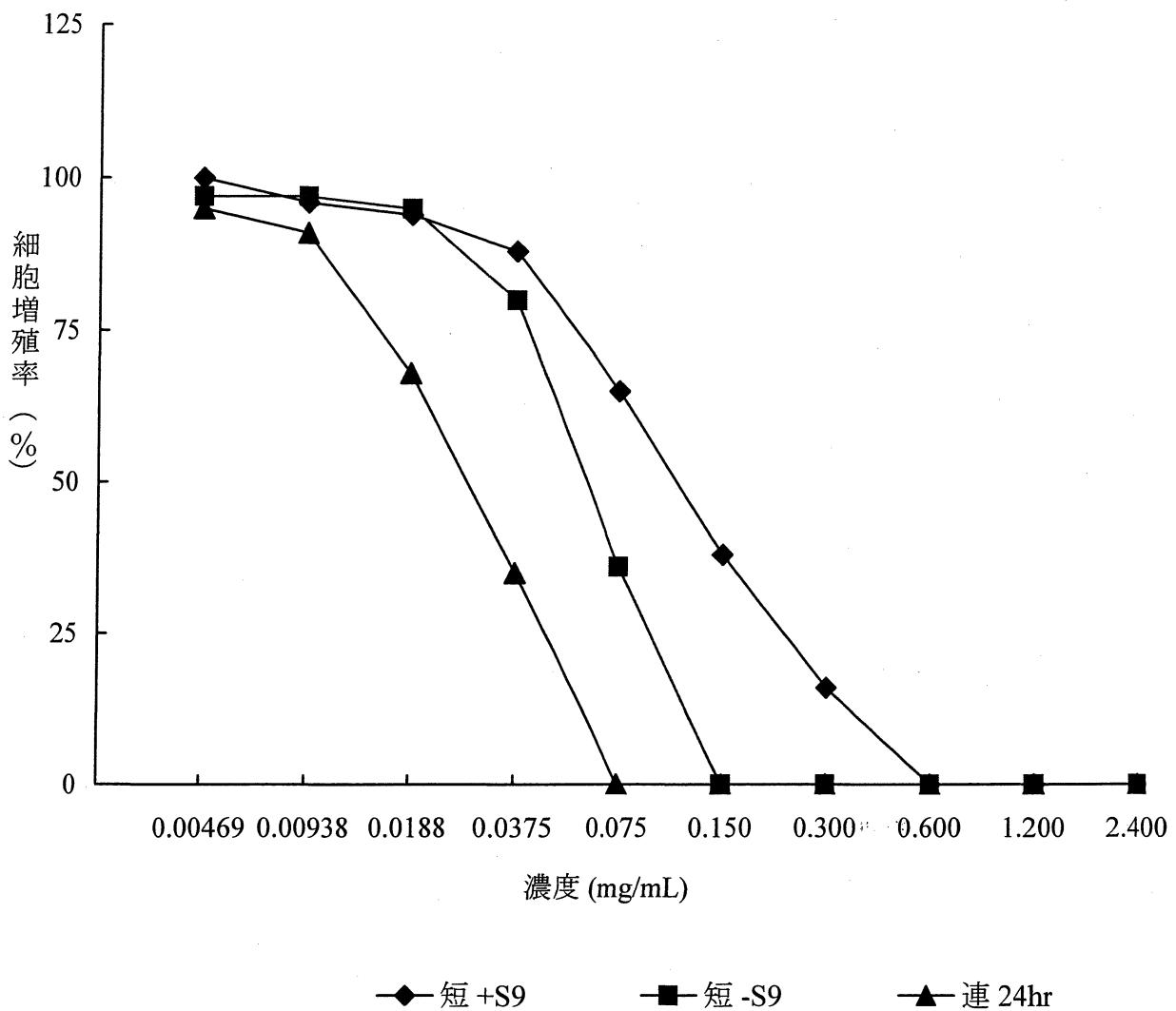
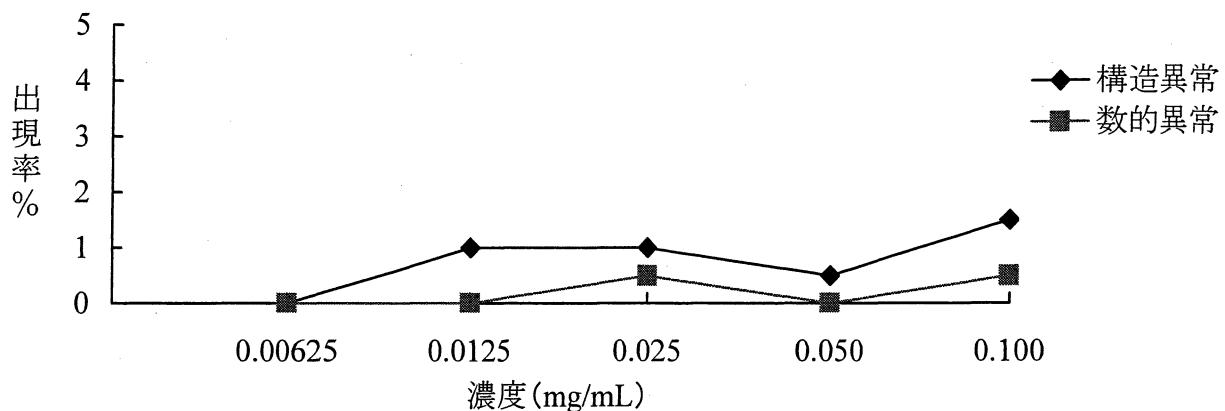


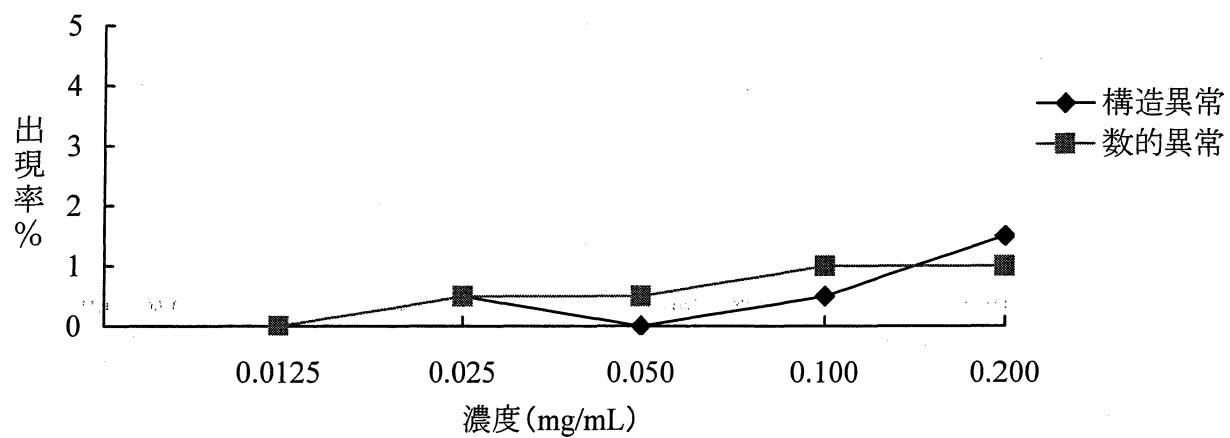
図2 用量反応曲線

Study No. 971024

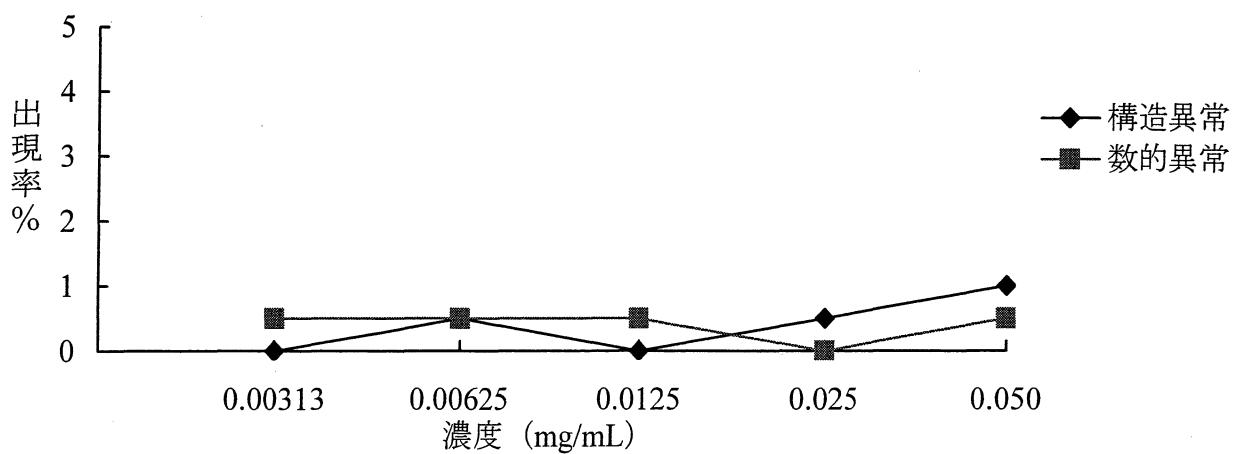
短時間処理法(-S9mix)



短時間処理法(+S9mix)



連続処理法(24hr)



被験物質名 : 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン (CAS No.6362-80-7)

試験系 : チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU細胞)

試験委託者 : 厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設 : 株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的 : 2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、
その染色体異常誘発性の有無について検討した。

準拠したガイドライン :

「OECD化学品テストガイドライン, 473 In vitro 哺乳類動物細胞を用いる染色体異常試験」(1997年7月21日採択), 平成15年11月21日付(薬食発第1121002号: 厚生労働省医薬食品局長, 平成15・11・13製局第2号: 経済産業省製造産業局長, 環保企発第031121002号: 環境省総合環境政策局長連名通知)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「化学物質の慢性毒性試験, 生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験, 催奇形性試験, 変異原性試験, がん原性試験, 生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守したGLP : 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準(平成15年11月21日, 薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環保企発第031121004号)並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

試験開始日 : 2005年 1月 31日

試験終了日 : 2006年 11月 13日

試験実施日 : 試験系細胞の再培養実施日 (実験開始日) 2005年 2月 15日

細胞増殖抑制試験

細胞播種日 2005年 2月 25日

検体液添加日 2005年 2月 28日

細胞数測定日 2005年 3月 1日

染色体異常試験

1) 短時間処理法

細胞播種日 2005年 3月 11日

検体液添加日 2005年 3月 14日

標本作製及び細胞数測定日 2005年 3月 15日

要 約

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの染色体異常誘発性の有無を、ほ乳類の培養細胞(CHL/IU細胞)を用い、短時間処理法(6時間処理のS9 mix添加及びS9 mix無添加)と連続処理法(24時間処理)で検討した。

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの試験濃度は、細胞増殖抑制試験の結果から、50%細胞増殖抑制濃度及び細胞の生存率を指標に、短時間処理法のS9 mix添加では12.5, 25, 50, 100及び200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, S9 mix無添加では6.25, 12.5, 25, 50及び100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 連続処理法(24時間処理)では3.13, 6.25, 12.5, 25及び50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の公比2, 5段階を設定した。

試験の結果、連続処理法及び短時間処理法とも、数的及び構造的異常細胞の出現率は5%未満であった。

各試験系列で用いた陽性対照物質は、明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、当試験施設のバックグラウンドデータのほぼ範囲内であった。

以上の結果、本試験条件下において、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンに染色体異常誘発性はないと判定する。

Table 1. Cell growth inhibition test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells
 -The short treatment method-

Test Substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Treated for 6 hr with S9 mix			Treated for 6 hr without S9 mix		
		No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	68	100	—	64	100	—
	4.69	68	100		62	97	
	9.38	65	96		62	97	
	18.8	64	94		61	95	
	37.5	60	88		51	80	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1, ,3-propanediyl) bisbenzene	75	44	65	101.5	23	36	52.6
	150	26	38		0	0	
	300*	11	16		0	0	
	600*	0	0		0	0	
	1200*	0	0		0	0	
	2400*	0	0		0	0	

a): (1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group / negative control) $\times 100$.

*: White oily precipitations were noted at the time of application of the test solution and clean oily precipitations were noted on completion of the incubation.

Table 2. Cell growth inhibition test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells
 -The continuous treatment method-

Test Substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Treated for 24 hr		
		No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	65	100	—
	4.69	62	95	
	9.38	59	91	
	18.8	44	68	
	37.5	23	35	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	75	0	0	23.9
	150	0	0	
	300*	0	0	
	600*	0	0	
	1200*	0	0	
	2400*	0	0	

a) : (1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group / negative control) $\times 100$.

*: White oily precipitations were noted at the time of application of the test solution and clean oily precipitations were noted on completion of the incubation.

Table 3. Chromosomal aberration test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells
— The short treatment method —

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations												Survival ratio ^e (%)
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^a (%)	Judgement ^b	Types ^c and numbers (cumulative)						No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^d (%)		Judgement ^b		
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)			
Negative control	—	+	200	2	0	1.0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100	
	12.5	+	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	98	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	25	+	200	1	0	0.5	—	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	90
	50	+	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	71	
	100	+	200	2	0	1.0	—	0	1	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	49	
	200	+	200	2	0	1.0	—	0	2	0	1	0	0	3	3	1.5	1.5	—	30	
Dimethylnitrosamine	500	+	200	1	0	0.5	—	0	66	0	107	0	0	137	137	68.5	68.5	+	83	
Negative control	—	—	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	100	
	6.25	—	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	98	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	12.5	—	200	0	0	0	—	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	—	98	
	25	—	200	1	0	0.5	—	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	—	82	
	50	—	200	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	53	
	100	—	200	1	0	0.5	—	0	3	0	0	0	0	3	3	1.5	1.5	—	31	
Mitomycin C	0.1	—	200	0	0	0	—	0	57	0	72	0	0	105	105	52.5	52.5	+	89	

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.

e): {1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group or positive control / negative control} $\times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

Table 4. Chromosomal aberration test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells
 — The continuous treatment method —

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio (%)	
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)					No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)				
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Negative control	—	24	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	100	
	3.13	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	98
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	6.25	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100
779	12.5	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	82
	25	24	200	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	48
	50	24	200	1	0	0.5	—	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	—	27
Mitomycin C	0.05	24	200	0	0	0	—	0	47	0	67	0	0	93	93	46.5	46.5	+	85

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.

e): {1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group or positive control / negative control} $\times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

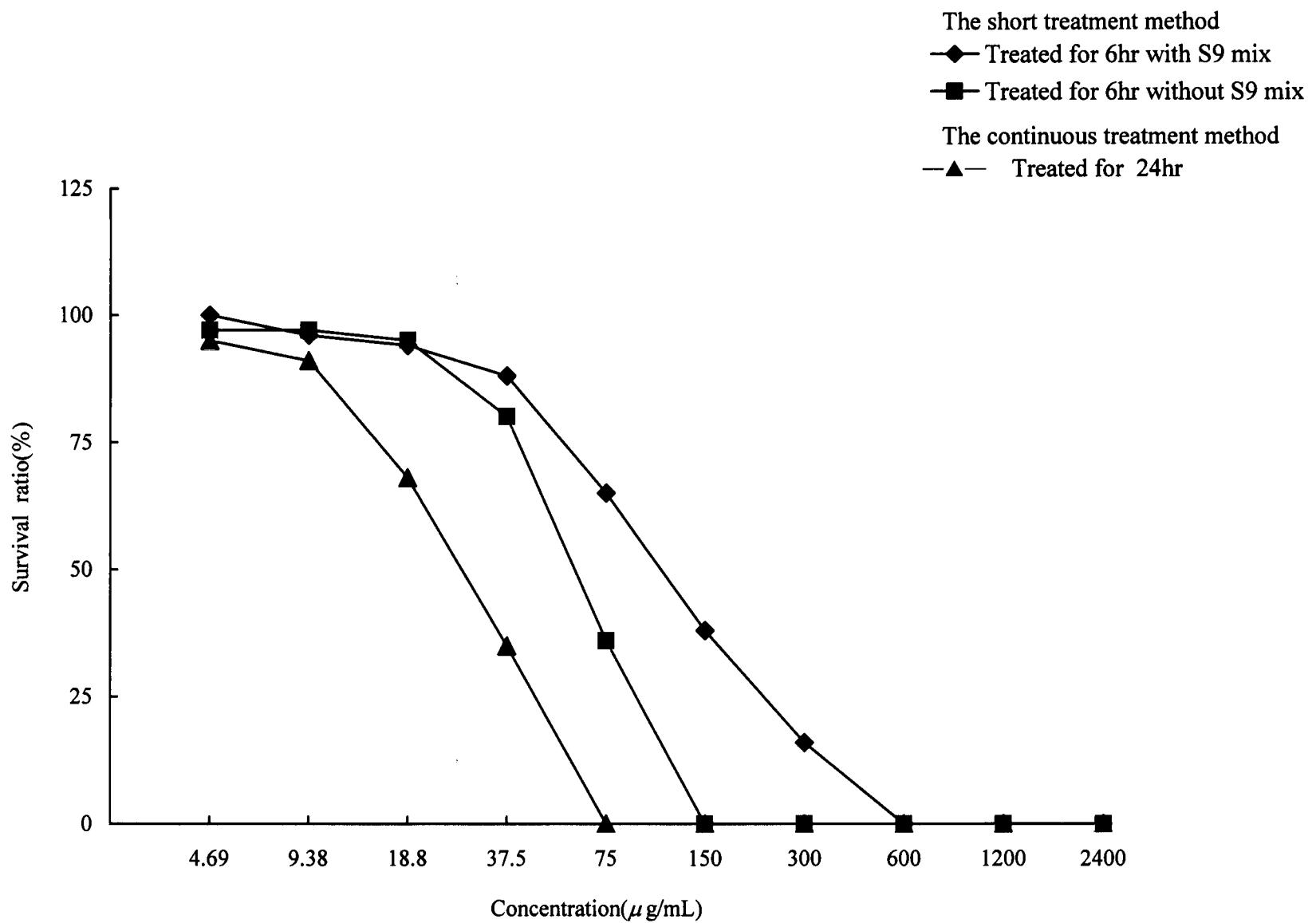


Figure 1. Cell growth inhibition test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in cultured CHL cells.

Study No. 971024

**Appendix 1-1. Chromosomal aberration test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells
-The short treatment method-**

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations								Survival ratio ^{e)} (%)			
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No. of cells with chromosome aberration	Incidence ^{d)} (%)	Judgement ^{b)}			
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg						
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	+	100	1	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	100
			100	1	0			0	1	0	0	0	0	1	1				
	12.5	+	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0				
	25	+	100	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	90
			100	0	0			0	1	0	0	0	0	1	1				
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	50	+	100	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	71
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0				
	100	+	100	1	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	49
			100	1	0			0	1	0	1	0	0	1	1				
	200	+	100	2	0	1.0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	1.5	1.5	—	30
			100	0	0			0	1	0	1	0	0	2	2				
Dimethylnitrosamine	500	+	100	1	0	0.5	—	0	24	0	48	0	0	62	62	68.5	68.5	+	83
			100	0	0			0	42	0	59	0	0	75	75				

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.e): {1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group or positive control / negative control} $\times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

Appendix 1-2. Chromosomal aberration test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells
 -The short treatment method-

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)	
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)	Judgement ^{b)}		
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)				
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	—	100	0	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	6.25	—	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	12.5	—	100	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	1.0	1.0	98	
			100	0	0			0	1	0	0	0	0	1	1	1.0	1.0		
-278 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	25	—	100	0	0	0.5	—	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	82	
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	50	—	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	53	
			100	0	0			0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5		
	100	—	100	0	0	0.5	—	0	2	0	0	0	0	2	2	1.5	1.5	31	
			100	1	0			0	1	0	0	0	0	1	1	1.5	1.5		
Mitomycin C	0.1	—	100	0	0	0	—	0	26	0	31	0	0	46	46	52.5	52.5	+	
			100	0	0			0	31	0	41	0	0	59	59	52.5	52.5	89	

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.

e): {1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group or positive control / negative control} $\times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

**Appendix 2. Chromosomal aberration test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells
—The continuous treatment method—**

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	Numerical aberration			Judgement ^{b)}	Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)			
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)		Types ^{c)} and numbers (cumulative)					No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)						
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)				
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	24	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100			
			100	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	3.13	24	100	0	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98			
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	6.25	24	100	0	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	100			
			100	1	0			0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5				
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	12.5	24	100	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82			
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	25	24	100	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	48			
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	50	24	100	1	0	0.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	1.0	1.0	27			
			100	0	0			0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5				
Mitomycin C	0.05	24	100	0	0	0	—	0	23	0	36	0	0	48	48	46.5	46.5	+	85		
			100	0	0			0	24	0	31	0	0	45	45	0	0				

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.e): {1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group or positive control / negative control} $\times 100$.

(+)g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.