

資料 3 - 1 - 5

既存化学物質の人健康影響に関する情報（第一種特定化学物質審議関係②）

（平成 17 年 11 月 18 日）

- No. 6 1,1-ビス (tert-ブチルジオキシ) -3,3,5-トリメチルシクロヘキサン ……p. 1
- No. 18 2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル) フェノール……p. 62

6-1. 1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの 28 日間試験・Ames 試験・染色体異常試験

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

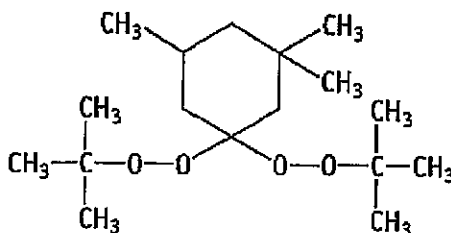
[CAS No. 6731-36-8]

1,1-Bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane

1,1-ビス(*tert*-ブチルペルオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

Molecular formula:  $C_{17}H_{31}O_4$

Molecular weight: 302.45



ABSTRACT

A single dose oral toxicity test of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane revealed an  $LD_{50}$  value of more than 2000 mg/kg for both sexes.

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane was studied for oral toxicity in rats in a 28-day repeat dose toxicity test at doses of 0, 100, 300 and 1000 mg/kg. One male animal in the 1000 mg/kg group died during the recovery period. Repeated administration of test substance caused centrilobular hypertrophy of hepatocytes in the female animals given 100 mg/kg and more, and in the male animals given 300 mg/kg and more. The female animals receiving 100 mg/kg and more also showed enhanced periportal fatty change and a decreased A/G ratio. In addition, in the 1000 mg/kg group, animals of both sexes demonstrated a prolonged blood coagulation time, and increased GPT activity, suggesting hepatic dysfunction. In the male animals given 100 mg/kg and more, intracytoplasmic eosinophilic inclusive bodies appeared in the proximal renal tubules, suggesting renal toxicity of the test substance. Thus, the NOEL for the 28-day repeat dose oral toxicity test of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane is considered to be less than 100 mg/kg/day for males and females.

Genotoxicity of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane was studied by the reverse mutation test in bacteria and by the chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster lung (CHL/IU) cells.

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane was not mutagenic in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA*, with or without an exogenous metabolic activation system.

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane did not induce chromosomal aberrations in CHL/IU cells, with and without an exogenous metabolic activation system.

---

## SUMMARIZED DATA FROM THE STUDIES

### 1. Single Dose Oral Toxicity <sup>1)</sup>

Purity	: 97.9 %
Test species/strain	: Rat/Crj:CD(SD)IGS
Test method	: OECD Test Guideline 401
Route	: Oral (gavage)
Doses	: Males, 0 (vehicle), 1000, 2000 mg/kg Females, 2000 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 5; females, 5
Vehicle	: Corn oil
GLP	: Yes

#### Test results:

No death occurred in any group. Clinical signs of diarrhea or soft feces were observed in all groups on the treatment day. No effects were found on body weight or autopsy findings.

The LD<sub>50</sub> value was concluded to be more than 2000 mg/kg for both sexes.

### 2. Repeat Dose Toxicity <sup>1)</sup>

Purity	: 97.9 %
Test species/strain	: Rat/Crj:CD(SD)IGS
Test method	: Guideline for 28-Day Repeated Dose Toxicity Test in Mammalian Species (Chemical Substances Control Law of Japan)
Route	: Oral (gavage)
Doses	: 0 (vehicle), 100, 300, 1000 mg/kg/day
Number of animals/group	: Males, 10; females, 10 (0, 1000 mg/kg) Males, 5; females, 5 (100, 300 mg/kg)
Vehicle	: Corn oil
Administration period	: Males and females, 28 days
Terminal kill	: Males and females, on days 29 and 43
GLP	: Yes

#### Test results:

No deaths occurred during the administration period, but one male animal in the 1000 mg/kg group died on the 3rd day of the recovery period. On hematological examination, animals of both sexes in the 1000 mg/kg group showed a tendency for prolongation or significant prolongation of prothrombin and activated partial thromboplastin time. Regarding blood chemistry, male animals in the 1000 mg/kg group showed a significant decrease in plasma glucose and a significant increase in GPT activity. The female animals in this group showed significant increases in  $\gamma$ -GTP activity and total protein level in addition to increase in GPT activity. Females receiving 100 mg/kg showed a significant decrease in albumin level. The A/G ratio in the test substance groups was significantly decreased. Dose-dependent increases in organ weights of the liver and the kidneys were observed in the animals of both sexes of the test substance groups. Histopathological examination revealed centrilobular hypertrophy of hepatocytes which became evident dose-dependently in male animals given 300 mg/kg and more, and in the female animals given 100 mg/kg and more. Dose-dependent periportal fatty change was found in female animals. In the kidneys of all the male animals of

the test substance groups intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies and eosinophilic bodies were found in the proximal tubules and the degree of the former increased with increasing dose.

Thus, the NOEL for the 28-day repeat dose toxicity is considered to be less than 100 mg/kg/day for males and females.

### 3. Genetic Toxicity

#### 3-1. Bacterial test <sup>2)</sup>

Purity	:	97.9 %
Test species/strain	:	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537, <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
Test method	:	Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Chemical Substances Control Law of Japan) and OECD Test Guideline 471
Procedures	:	Pre-incubation method
Solvent	:	DMSO
Positive controls	:	-S9 mix; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (TA100, TA98, WP2 <i>uvrA</i> ), Sodium azide (TA1535) and 9-Aminoacridine (TA1537) +S9 mix; 2-Aminoanthracene (all strains)
Doses	:	-S9 mix; 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate +S9 mix; 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate
S9	:	Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
Plates/test	:	3
Number of replicates	:	2
GLP	:	Yes

#### Test results:

This chemical did not induce gene mutations in the *S. typhimurium* and *E. coli* strains. Toxicity was not observed in any strain, with and without S9 mix.

#### Genotoxic effects:

##### *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537

	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]

##### *Escherichia coli* WP2 *uvrA*

	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]

3-2. Non-bacterial *in vitro* test (chromosomal aberration test) <sup>2)</sup>

Purity	:	97.9 %
Type of cell used	:	Chinese hamster lung (CHL/IU) cells
Test method	:	Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Chemical Substances Control Law of Japan) and OECD Test Guideline 473
Solvent	:	DMSO
Positive controls	:	-S9 mix; 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine +S9 mix; 3,4-Benzo[ <i>a</i> ]pyrene
Doses	:	-S9 mix (6 hr short-term treatment) : 0, 93.75, 187.5, 375, 750, 1500, 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +S9 mix (6 hr short-term treatment) : 0, 375, 750, 1500, 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -S9 mix (24 hr continuous treatment) : 0, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
S9	:	Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
Plates/test	:	2
GLP	:	Yes

Test results:

With 6 hr short-term treatment, chromosomal aberrations were not induced with and without S9 mix. Moreover, chromosomal aberrations were not induced after 24 hr continuous treatment without S9 mix.

Cytotoxicity was not observed in the 6 hr short-term treatment with and without S9 mix and the 24 hr continuous treatment without S9 mix.

Genotoxic effects:

	clastogenicity			polyploidy		
	+	?	-	+	?	-
Without metabolic activation:	[ ]	[ ]	[*]	[ ]	[ ]	[*]
With metabolic activation:	[ ]	[ ]	[*]	[ ]	[ ]	[*]

- 1) The tests were performed by the Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523, Japan. Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627
- 2) The tests were performed by the Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology, 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa 229-1132, Japan. Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

# 1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの ラットを用いる単回経口投与毒性試験

## Single Dose Oral Toxicity Test of 1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in Rats

### 要約

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの1000および2000 mg/kgを1群5匹からなる5週齢の雄ラットに、雌ラット5匹には2000 mg/kgを単回経口投与した。媒体対照として、雄5匹にコーン油を投与した。

全投与群で投与日に下痢便あるいは軟便の排泄がみられた。体重の推移および剖検所見には、変化は認められなかった。

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのLD<sub>50</sub>値は、雌雄ともに2000 mg/kgを上回ると推定された。

### 方法

#### 1. 被験物質

被験物質として、日本油脂(株)(愛知)より提供された無色透明の液体である1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン(Lot No.8X01, 純度97.9%)を用いた。受領物質は、使用時まで冷蔵保管した。なお試験終了後、残余被験物質を提供元で再分析し、被験物質が試験期間中安定であったことを確認した。

投与検体の調製においては、各用量毎に被験物質を秤量し、所定濃度となるようにコーン油(Lot No.V8P7069, ナカライテスク(株))を加えて溶解し、投与時まで冷蔵・遮光下で保存し、調製3日後に使用した。なお、2および20 w/v%に調製した被験物質は、冷蔵、遮光条件下で12日間安定であることを確認した。また、各投与検体の含量を測定した(95.7~99.9%)。

#### 2. 使用動物および飼育方法

4週齢のSprague-Dawley系(Crj:CD(SD)IGS)雌雄ラットを、日本チャールス・リバー(株)筑波飼育センターから購入し、検疫と馴化を兼ねて8日間予備飼育した。試験には、予備飼育中、動物の一般状態に異常が認められなかった雄15匹、雌5匹を用い、雄は検疫終了時の体重を基に体重別層化無作為抽出法により1群5匹からなる3群に分け、雌は無作為に5匹を選んで1群とした。投与開始時の週齢は雌雄ともに5週齢であり、体重は雄が123.8~144.3 g、雌が109.6~121.4 gであった。

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、温度23~25℃、湿度50~65%、換気回数約15回/時、照明12時間(7時~19時点灯)に設定された

飼育室で、固型飼料(CE-2, 日本クレア(株))および水道水(栗野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。

#### 3. 投与量の設定および投与方法

投与量は、文献調査(RTECS No.:SD8600000)の結果および本被験物質のラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験の予備試験の結果に基づいて決定した。すなわち、本被験物質のラットにおける単回投与時のLD<sub>50</sub>値は12918 mg/kgであり、予備試験において1000 mg/kgを投与した雌で投与初期に体重の増加抑制が認められたことから、雄では、1000および2000 mg/kgの2用量を設定し、加えて媒体対照群としてコーン油を被験物質投与群と同容量投与する群を設けた。また、予備試験では明らかな性差は認められなかったことから、雌については、2000 mg/kgの1用量を設定した。

投与容量は体重1 kg当たり10 mLとし、動物を約18時間絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。給餌は投与後約3時間に行った。

#### 4. 観察および検査

観察第1日(投与日)から14日間にわたって死亡の有無を確認し、各動物の一般状態を観察した。観察は投与日においては投与直後から1時間まで連続して行い、その後は投与後6時間まで約1時間間隔で実施した。観察第2日から15日までは毎日1回行った。

体重は全例について、投与直前、観察第2, 4, 8, 11および15日に測定した。

剖検は、観察第15日に全例をペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血屠殺して実施した。

### 結果および考察

雌雄ともに、死亡例はなかった。

一般状態では全投与群で投与日に下痢便あるいは軟便の排泄がみられた。また、2000 mg/kg投与群の雄3例では投与日あるいは観察第2日に肛門周囲の汚れが観察された。

体重は、雌雄ともに順調に増加した。

剖検においても雌雄いずれの器官・組織にも変化は認められなかった。

以上の結果から、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのLD<sub>50</sub>値は、雌雄ともに2000 mg/kgを上回ると推定された。

文献

- 1) 三井雅之, 古川文夫, 鈴木順子, 榎並倫宣, 西川秋佳, 高橋道人, 国立衛生試験所報告, 110, 42(1992).

連絡先

試験責任者: 永田伴子  
試験担当者: 勝村英夫, 松本浩孝, 堀内伸二,  
三枝克彦, 稲田浩子, 安生孝子  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tomoko Nagata (Study director)  
Hideo Katsumura,  
Hirotaka Matsumoto,  
Shinji Horiuchi, Katsuhiko Saegusa,  
Hiroko Inada, Takako Anjo  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center,  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,  
Japan.  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

1,1-ビス[tert-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの  
ラットを用いた 52 週間反復経口投与毒性試験

Table  
(図及び群別表)



## 目次

	頁
Figure 1 Body weight changes (Male) .....	1
Figure 2 Body weight changes (Female) .....	2
Figure 3 Food consumption (Male) .....	3
Figure 4 Food consumption (Female) .....	4
Table 1 Clinical signs - Male, Female .....	5
Table 2 Body weights - Male, Female .....	39
Table 3 Food consumption - Male, Female .....	41
Table 4 Urinary findings - Male, Female, 13w .....	43
Table 5 Urinary findings - Male, Female, 52w .....	47
Table 6 Hematological findings - Male, Female, 13w .....	51
Table 7 Hematological findings - Male, Female, 52w .....	54
Table 8 Biochemical findings - Male, Female, 13w .....	57
Table 9 Biochemical findings - Male, Female, 52w .....	60
Table 10 Necropsy findings - Male, Female, 13w .....	63
Table 11 Necropsy findings - Male, Female, 52w .....	64
Table 12 Absolute and relative organ weights - Male, Female, 13w .....	66
Table 13 Absolute and relative organ weights - Male, Female, 52w .....	70
Table 14 Histopathological findings - Male, Female, 13w .....	74
Table 15 Histopathological findings - Male, Female, 52w .....	83

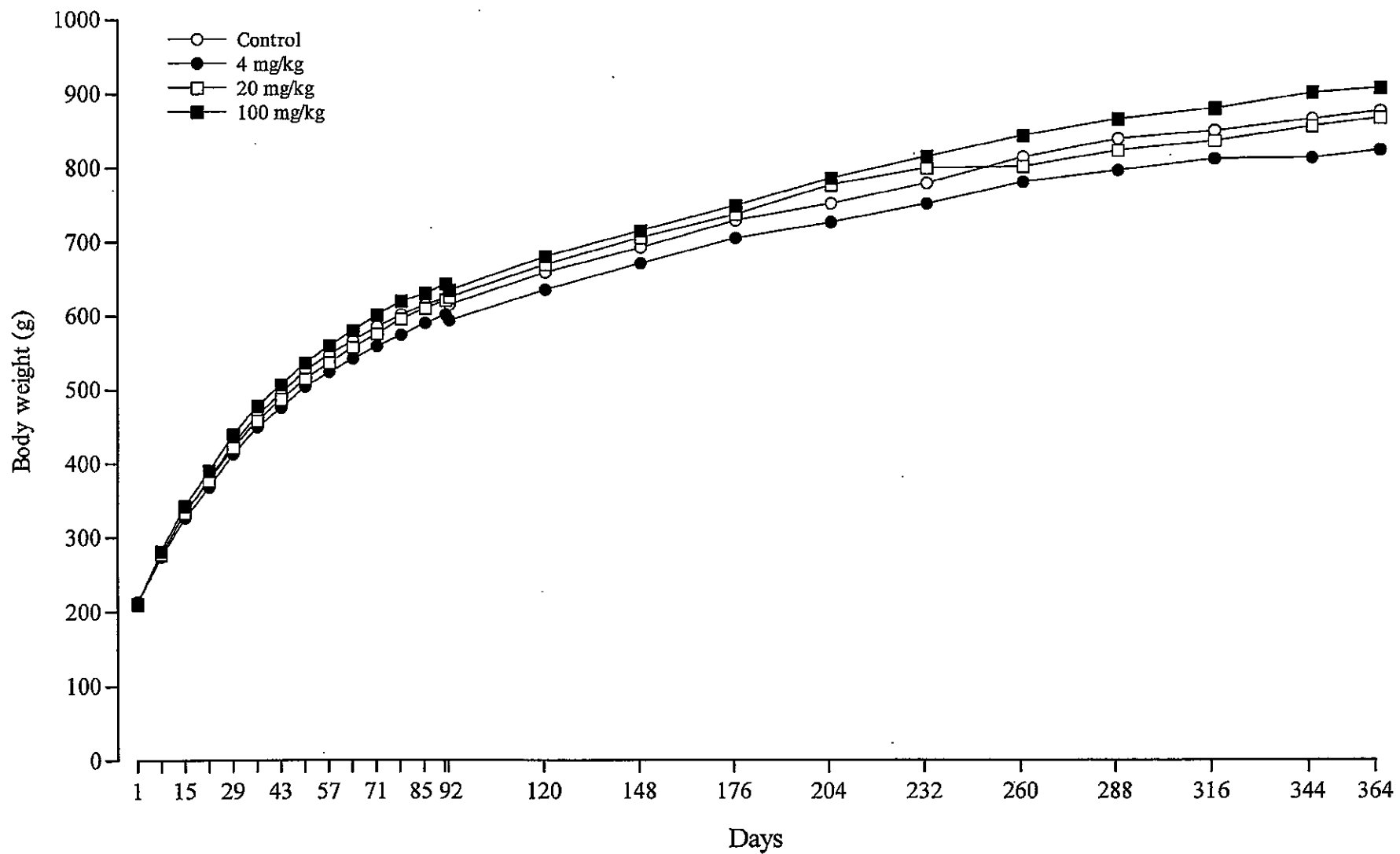


Figure 1 Body weight changes (Male)

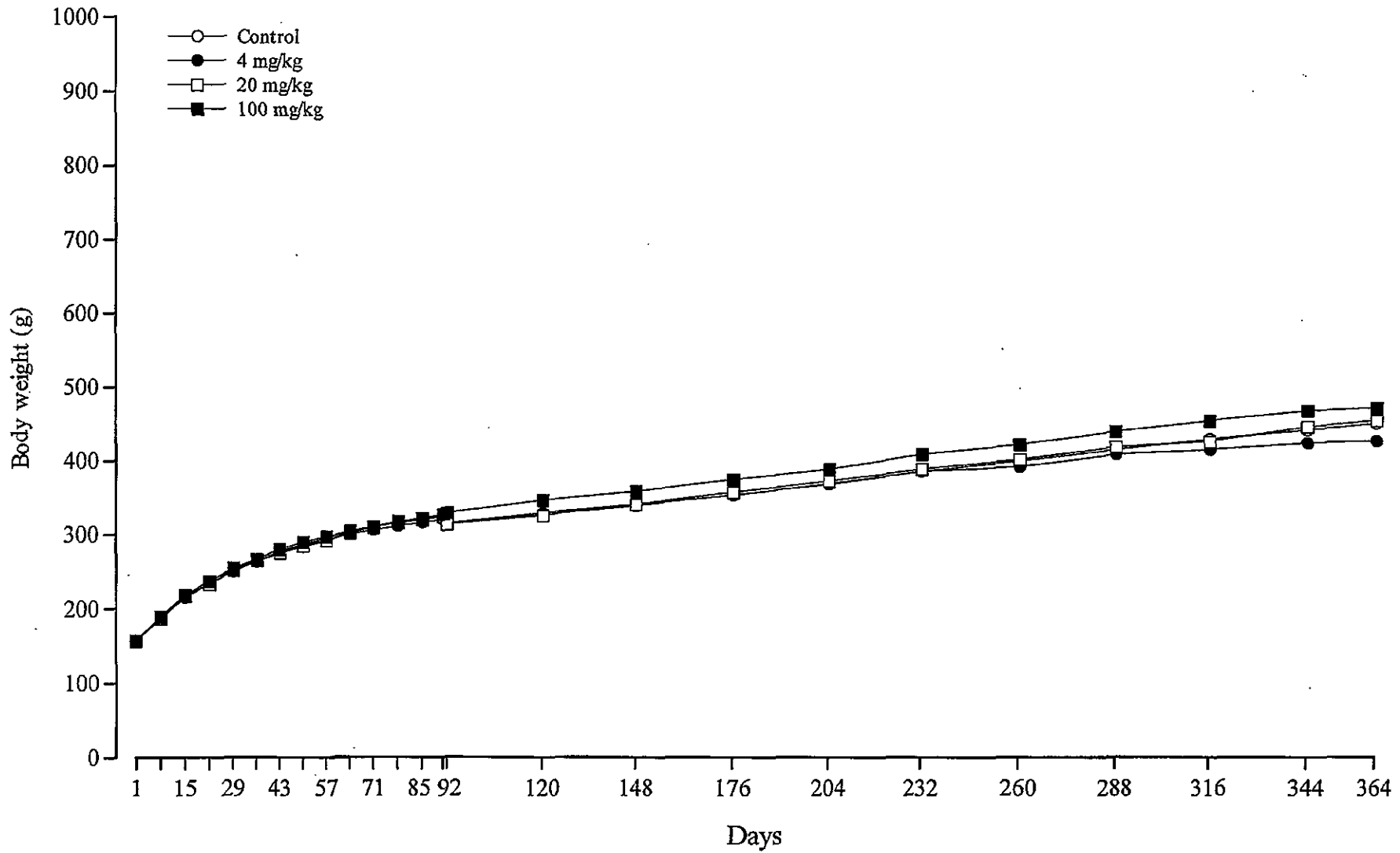


Figure 2 Body weight changes (Female)

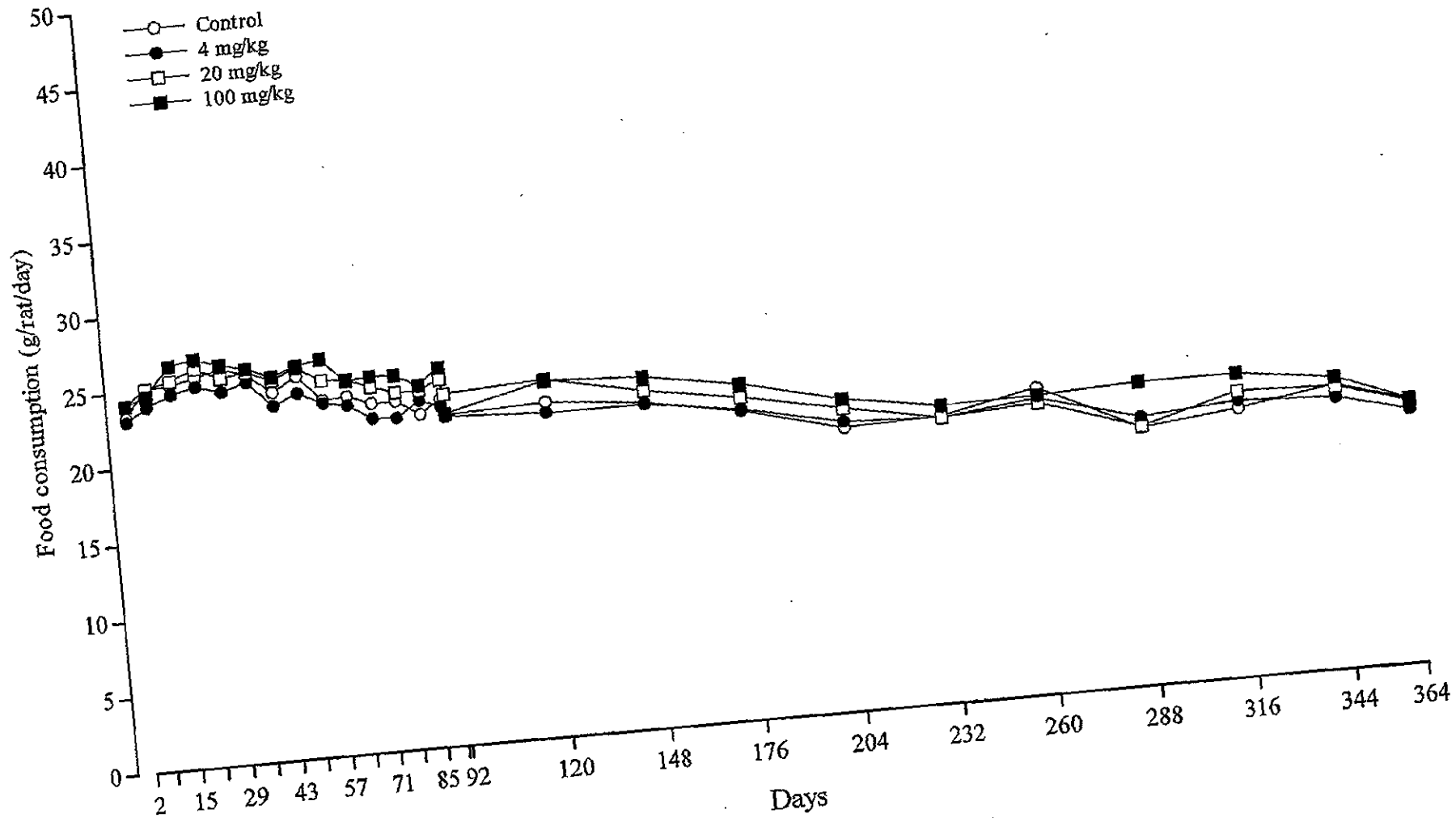


Figure 3 Food consumption (Male)

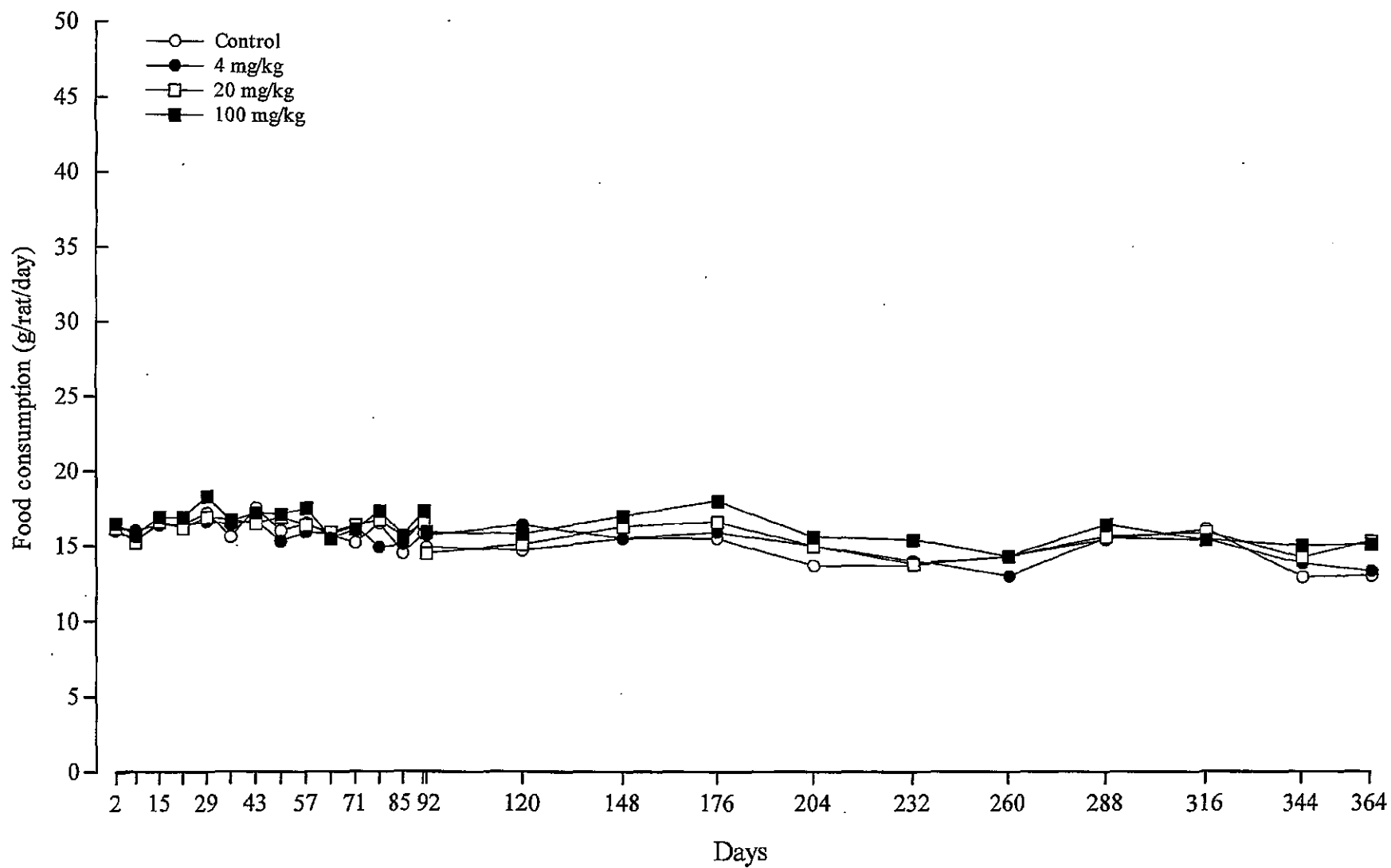


Figure 4 Food consumption (Female)

## 試験成績

### 1. 予期し得なかった事態

投与 85 日の投与時に動物 (No.526) が噛み切ったゾンデを誤飲させたことによる投与過誤が生じた。その日の投与後の観察時に何ら変化はみられなかったものの、翌日 (投与 86 日) には呼吸緩徐を呈していたこと、誤飲させたゾンデを取り除くことができないと判断したことから、試験途中で剖検した。剖検では、動物が噛み切ったゾンデが食道から胃にかけて停留し、ゾンデの切断部が接触していた食道粘膜で陥凹、先端部が接触していた腺胃粘膜で暗赤色点が認められた。さらに、頸部皮下の浮腫様変化も認められた。本例については、剖検時に採血を行い、血液学的検査及び血液生化学的検査を実施したが、明らかな投与過誤が生じていることから、試験の評価・解析から除外した。なお、病理組織学的検査は実施しなかった。

### 2. 一般状態の観察

観察結果を Table 1 及び Appendix 1, 2 に示した。

#### 1) 生存例

対照群を含む各群の雌雄で胼胝が認められた。胼胝は、雄では対照群 5 例、4 mg/kg 群 5 例、20 mg/kg 群 5 例及び 100 mg/kg 群 6 例、雌では対照群 3 例、4 mg/kg 群 2 例、20 mg/kg 群 1 例及び 100 mg/kg 群 3 例でみられ、胼胝からの出血も散見された。このうち、対照群の雌雄各 1 例、4 mg/kg 群の雄 2 例、20 mg/kg 群の雄 2 例、100 mg/kg 群の雄 1 例では回復したものの、その他の動物では投与期間終了時まで認められた。胼胝は対照群を含む各群で認められ、対照群と比較して被験物質投与群で発生頻度の増加あるいは程度の増強がみられなかったこと、かつ後述する病理組織学的検査で被験物質投与に起因した変化が認められなかったことから、自然発生性の変化と判断した。また、対照群の雌雄各 1 例、並びに 4, 20 及び 100 mg/kg 群の雌各 1 例で腫瘤が認められた。このうち、4 mg/kg 群の雌 1 例 (No.638) で認められた腫瘤では潰瘍がみられ、潰瘍からの出血と思われる血痕が受け皿上に認められた。本例では、皮膚蒼白、眼球蒼白及び活動性低下も認められ、潰瘍からの出血に伴った変化と考えられた。腫瘤は対照群を含む各群で認められ、対照群と比較して被験物質投与群で発生頻度が増加あるいは程度の増強がみられなかったこと、かつ後述する病理組織学的検査で被験物質投与に起因した変化が認められなかったことから、自然発生

性の変化と判断した。このほか、20 mg/kg 群の雄 1 例 (No.560) で投与 350 日より四肢の腫脹 (左右後肢の腫脹)、100 mg/kg 群の雌 1 例 (No.674) で投与 357 日より四肢の腫脹 (右後肢の腫脹) が認められたが、雌雄各 1 例のみの変化であること、かつ後述する病理組織学的検査で被験物質投与に起因した変化が認められなかったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。対照群では、雄 1 例 (No.507) で投与 85 日より剖検時 (13 週間投与終了時) まで左眼球の瞳孔異常が認められた。

## 2) 途中剖検例及び死亡例

投与期間中に、4 mg/kg 群の雄 1 例、20 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例、並びに 100 mg/kg 群の雄 1 例が死亡し、4 mg/kg 群の雄 1 例を瀕死と判断し、試験途中で剖検した。死亡例及び瀕死例は対照群を含む各群で認められ、被験物質投与による増強がみられていないこと、かつ後述する病理組織学的検査で死因となりうる被験物質投与に起因した変化が認められていないことから、自然発生性の変化によるものと判断した。

### 【死亡例】

- No.536 (4 mg/kg 群, 雄)

投与 343 日に死亡した。本例では、投与 152 日より膀胱がみられていたものの、その他の一般状態に何ら変化は認められなかった。

- No.551 (20 mg/kg 群, 雄)

投与 256 日に死亡した。本例では、投与 207 日より膀胱がみられていたものの、その他の一般状態に何ら変化は認められなかった。

- No.554 (20 mg/kg 群, 雄)

投与 202 日に死亡した。本例では、死亡までの一般状態に何ら変化は認められなかった。

- No.651 (20 mg/kg 群, 雌)

投与 303 日に死亡した。本例では、投与 299 日より、活動性低下、腹式呼吸及び立毛が認められた。

- No.564 (100 mg/kg 群, 雄)

投与 86 日に死亡した。本例では、死亡前日に活動性低下、呼吸緩徐、下腹部汚染及び鼻周囲汚染が認められた。

### 【途中剖検例】

- No.537 (4 mg/kg 群, 雄)

投与 98 日より活動性低下、下腹部汚染、よろめき歩行 (後肢の麻痺) 及び赤色尿 (尿

試験紙; 潜血・ヘモグロビン+++ ) が認められ、投与 100 日には前述の症状に加え、呼吸緩徐、皮膚蒼白及び体温低下が認められたことから、瀕死と判断し、試験途中で剖検した。

### 3. 体重測定

体重の推移、測定結果を Figure 1, 2, Table 2 及び Appendix 3, 4 に示した。

投与期間を通して、各被験物質投与群で対照群と比較して有意な差は認められなかった。

個別では、No.638 (4 mg/kg 群, 雌) で投与 344 及び 364 日, No.673 (100 mg/kg 群, 雌) で投与 364 日に体重減少が認められた。また、死亡した No.564 (100 mg/kg 群, 雄) では、死亡前日 (投与 85 日) に体重減少が認められた。

### 4. 摂餌量の測定

摂餌量の推移、測定結果を Figure 3, 4, Table 3 及び Appendix 5, 6 に示した。

100 mg/kg 群の雄で、投与 57 及び 85 日に摂餌量が高値を示したが、一過性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。

個別では、No.638 (4 mg/kg 群, 雌) で投与 364 日に低値が認められたが、本例では自然発生の腫瘍が潰瘍となり、その部位からと思われる出血も認められていることから、全身状態の悪化に伴った変化と判断した。また、No.564 (100 mg/kg 群, 雄) では、死亡前日の投与 85 日に摂餌の廃絶が認められた。

### 5. 尿検査

検査結果を Table 4, 5 及び Appendix 7~10 に示した。

#### 1) 13 週間投与終了時

各被験物質投与群で被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

#### 2) 52 週間投与終了時

20 mg/kg 群の雄では、尿 pH の酸性側への移行が認められたが、100 mg/kg 群で何ら変化がみられていないことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

### 6. 血液学的検査

検査結果を Table 6, 7 及び Appendix 11~15 に示した。

#### 1) 13 週間投与終了時

100 mg/kg 群の雌では、白血球形態検査で非染色性大型細胞数の増加が認められたが、白血球数及び白血球形態検査の他の細胞数に変化がみられないことから、被験物質投与と



は関連のない変化と判断した。

## 2) 52 週間投与終了時

100 mg/kg 群の雄では、白血球数並びに白血球形態検査の好中球数、リンパ球数、好塩基球数、単球数及び非染色性大型細胞数の高値、MCV 及び MCH の低値、PT 及び APTT の延長が認められた。また、20 及び 100 mg/kg 群の雌でヘモグロビン量の低値、100 mg/kg 群の雌でヘマトクリットの低値が認められた。個別では、4 mg/kg 群の雌 1 例 (No.638) で白血球数並びに白血球形態検査の好酸球数、好中球数、リンパ球数、好塩基球数、単球数及び非染色性大型細胞数の高値、ヘモグロビン、ヘマトクリット値、血小板数の低値、PT 及び APTT の短縮が認められたが、本例では自然発生性の腫瘍が潰瘍となり、その部位からと思われる出血が認められていることから、全身状態の悪化に伴った変化と判断した。なお、4 mg/kg 群の雌でヘマトクリットの低値が認められたが、前述した同群の雌 1 例 (No.638) を除く他の個体に同様の変化がみられていないことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。このほか、100 mg/kg 群の雌では PT の短縮が認められたが、APTT に変化がみられていないこと、かつ短縮であることから、毒性学的意義のない変化と判断した。

## 3) 途中剖検例

No.537 (4 mg/kg 群, 雄) では、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、網状赤血球数及び血小板数の低値、PT 及び APTT の延長、好酸球数、好中球数、リンパ球数及び単球数の低値が認められた。これらの変化は病理組織学的検査でみられた骨髄性白血病に伴った変化と判断した。

## 7. 血液生化学的検査

検査結果を Table 8, 9 及び Appendix 16~20 に示した。

### 1) 13 週間投与終了時

100 mg/kg 群の雄では、 $\beta$ -グロブリン比の高値及びクロールの低値が認められた。同群の雌では、A/G 比及びアルブミン比の低値、 $\beta$ -グロブリン比及び総コレステロールの高値が認められた。さらに、20 mg/kg 群の雌では、総コレステロールの高値が認められた。このほか、100 mg/kg 群の雌で総ビリルビンの低値がみられたが、低値であること、かつ軽微な変化であることから毒性学的意義のない変化と判断した。

### 2) 52 週間投与終了時

100 mg/kg 群の雄では、A/G 比及びアルブミン比の低値、 $\alpha_2$ -グロブリン比、 $\beta$ -グロブ

リン比及び ALT の高値が認められた。また、同群の雌で A/G 比、アルブミン比及びナトリウムの低値、総蛋白質、 $\alpha_1$ -グロブリン比、 $\beta$ -グロブリン比、総コレステロール及びリン脂質の高値が認められた。また、個別では、4 mg/kg 群の雌 1 例で (No.638) で  $\alpha_2$ -グロブリン比、 $\beta$ -グロブリン比、アルカリ性フォスファターゼ、尿素窒素、カルシウム、ナトリウム及びクロールの高値が認められたが、本例では自然発生性の腫瘤が潰瘍となり、その部位からと思われる出血も認められていることから、全身状態の悪化に伴った変化と判断した。

### 3) 途中剖検例

No.537 (4 mg/kg 群, 雄) では、総蛋白質、A/G 比、アルブミン比、カルシウム及びクロールの低値、 $\alpha_1$ -グロブリン比、 $\alpha_2$ -グロブリン比、 $\beta$ -グロブリン比、総ビリルビン、AST、ALT、アルカリ性フォスファターゼ、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、尿素窒素、クレアチニン、無機リン及びカリウムの高値が認められた。これらの変化は病理組織学的検査でみられた骨髄性白血病に伴った変化と判断した。

## 8. 剖検

検査結果を Table 10, 11 及び Appendix 21~26 に示した。

### 1) 13 週間投与終了時

100 mg/kg 群の雌 1 例で下垂体の肥大が認められたが、1 例のみの軽度の変化であったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。このほか、4 mg/kg 群の雄 1 例で精巢の肥大、20 mg/kg 群の雄 1 例で精巢上体の黄白色結節が認められたが、いずれも 100 mg/kg 群でみられていない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考えられた。対照群では、雄 1 例で左眼球の瞳孔異常が認められた。

### 2) 52 週間投与終了時

20 mg/kg 群の雄 1 例、100 mg/kg 群の雄 4 例及び雌 3 例で肝臓の肥大がみられ、100 mg/kg 群の雄 1 例で脾臓の肥大が認められた。また、4 mg/kg 群の雌 1 例でも脾臓の肥大が観察されたが、20 及び 100 mg/kg 群の雌では同様の変化が認められなかったこと、かつ本例では一般状態観察で自然発生性の腫瘤が潰瘍となり、その部位からと思われる出血も認められていることから、この出血に伴った変化と判断した。また、対照群及び 4 mg/kg 群の雌各 1 例並びに 100 mg/kg 群の雄 1 例で肝臓の暗赤色斑が認められたが、この変化はいずれも対照群と比較して被験物質投与群で発生頻度の増加あるいは程度の増強がみられなかったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。さらに、20 及び 100 mg/kg 群の雌

各 1 例で子宮内膜の嚢胞が認められたが、低頻度の変化であったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

上記に加えて、各群の雌雄全例で胸腺の小型化がみられ、対照群の雌 1 例及び 4 mg/kg 群の雄 1 例で腎臓の腎盂拡張、4 mg/kg 群の雄 1 例で腎臓の表面の粗造化が認められた。また、対照群の雌 7 例、4 mg/kg 群の雌雄各 1 例並びに 20 及び 100 mg/kg 群の雌各 3 例で乳腺の乳汁貯留、対照群及び 4 mg/kg 群の雌各 1 例、20 mg/kg 群の雌雄各 1 例並びに 100 mg/kg 群の雄 1 例で下垂体の暗赤色点、4 mg/kg 群の雌 1 例並びに 20 及び 100 mg/kg 群の雄各 1 例で下垂体の暗赤色腫瘍、対照群の雄 1 例、対照群、4 及び 20 mg/kg 群の雌各 2 例並びに 100 mg/kg 群の雌 3 例で皮下の灰白色腫瘍が認められた。さらに、対照群の雄 4 例及び雌 2 例、4 mg/kg 群の雌雄各 2 例、20 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例並びに 100 mg/kg 群の雄 4 例及び雌 2 例で後肢の胼胝、20 mg/kg 群の雄 1 例及び 100 mg/kg 群の雌 1 例で後肢の腫大が認められた。これらに加えて、対照群及び 20 mg/kg 群の雄 1 例で精巣の軟化、20 mg/kg 群の雄 1 例で精巣の小型化がみられ、対照群の雌 4 例、4 mg/kg 群の雌 1 例、20 mg/kg 群の雌 2 例並びに 100 mg/kg 群の雌 1 例で副腎の褐色点、対照群の雌 2 例で副腎の褐色結節が認められた。しかし、これらの変化はいずれも対照群と比較して被験物質投与群で発生頻度の増加あるいは程度の増強がみられなかったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

このほか、4 mg/kg 群の雄 1 例で脾臓の灰白色腫瘍、4 mg/kg 群の雌 1 例で副腎の肥大、4 mg/kg 群の雌 1 例で子宮の肥大、20 mg/kg 群の雄 1 例で甲状腺の灰白色結節が認められたが、いずれの変化も 100 mg/kg 群でみられていない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。対照群では、雄 1 例で肝臓の灰白色腫瘍、雌 1 例で脾臓の嚢胞が認められた。

### 3) 途中剖検例及び切迫屠殺例

投与期間中に、4 mg/kg 群の雄 1 例、20 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例、並びに 100 mg/kg 群の雄 1 例が死亡し、4 mg/kg 群の雄 1 例を瀕死と判断し、試験途中で剖検した。死亡例及び瀕死例は対照群を含む各群で認められ、被験物質投与による増強がみられていないこと、かつ後述する病理組織学的検査で死因となりうる被験物質投与に起因した変化が認められていないことから、自然発生性の変化によるものと判断した。また、4 mg/kg 群の雄 1 例を投与過誤により、試験途中で剖検した。

#### 【死亡例】

- ・ No.536 (4 mg/kg 群, 雄) では、肝臓の肥大、脾臓の褪色、胸腺の暗赤色化、副腎の褐色

点及び後肢の胼胝が認められた。

- ・ No.551 (20 mg/kg 群, 雄) では, 肝臓の肥大, 胸腺の小型化及び後肢の胼胝が認められた。
- ・ No.554 (20 mg/kg 群, 雄) では, 下垂体の灰白色腫瘍がみられ, 下垂体の腫瘍と大脳との癒着並びに胸腺の暗赤色化及び小型化が認められた。
- ・ No.651 (20 mg/kg 群, 雌) では, 胸腺の灰白色腫瘍がみられ, 胸腺の腫瘍と心嚢との癒着, 暗赤色の心嚢水の貯留及び肺の暗赤色化が認められた。
- ・ No.564 (100 mg/kg 群, 雄) では, 胸腔内の灰白色腫瘍, 血様胸水の貯留, 後大静脈腹部の血栓及び肝臓の肥大が認められた。

#### 【途中剖検例】

- ・ No.537 (4 mg/kg 群, 雄) では, 脾臓が肥大してその一部が破裂し, 破裂部に血様物が付着していた。さらに, 膀胱粘膜の暗赤色斑及び暗赤色尿の貯留, 肺の暗赤色化, 肝臓の褪色及び胸腺の小型化も認められた。

## 9. 器官重量の測定

測定結果を Table 12, 13 及び Appendix 27~32 に示した。

### 1) 13 週間投与終了時

20 mg/kg 群の雌では肝臓の相対重量の高値, 100 mg/kg 群の雌雄では肝臓の絶対及び相対重量の高値がみられ, さらに 100 mg/kg 群の雌では腎臓の相対重量の高値が認められた。このほか, 100 mg/kg 群の雌で甲状腺及び肺の相対重量の高値が認められたが, 後述する病理組織学的検査で何ら変化がみられていないことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

### 2) 52 週間投与終了時

4 mg/kg 群の雌で肝臓の相対重量, 20 mg/kg 群の雌並びに 100 mg/kg 群の雌雄で肝臓の絶対及び相対重量の高値が認められた。また, 100 mg/kg 群の雄で甲状腺の絶対及び相対重量の高値がみられ, 100 mg/kg 群の雌では腎臓の絶対重量の高値が認められた。

### 3) 途中剖検例及び切迫屠殺例

#### 【死亡例】

No.554 (20 mg/kg 群, 雄), No.651 (20 mg/kg 群, 雌) 及び No.564 (100 mg/kg 群, 雄) では, 剖検時の最終体重の低値が認められた。

#### 【途中剖検例】

No.537 (4 mg/kg 群, 雄) では, 剖検時の最終体重の低値, 肝臓の相対重量の高値, 脾臓並びに副腎の絶対及び相対重量の高値, 甲状腺並びに精巣の絶対重量の低値が認められた.

## 10. 病理組織学的検査

検査結果を Table 14, 15, Appendix 33~39 及び Photo. 1~10 に示した.

### 1) 13 週間投与終了時

被験物質投与に起因した変化が肝臓, 腎臓及び腸間膜リンパ節に認められた.

肝臓では, 20 mg/kg 群の雌 2 例, 100 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 9 例で小葉中心性の軽度ないし中等度の肝細胞肥大が認められ, 肥大した肝細胞は弱好酸性の均一な細胞質を有していた. また, 対照群の雄 3 例及び雌 1 例, 4 mg/kg 群の雄 3 例及び雌 1 例, 20 mg/kg 群の雄 5 例及び雌 2 例並びに 100 mg/kg 群の雄 3 例及び雌 4 例で小葉辺縁部の肝細胞の脂肪変性が認められたが, 対照群と 100 mg/kg 群との間で有意な差が認められなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した. このほか, 4 及び 20 mg/kg 群の雌各 1 例で肝細胞の巣状壊死, 20 mg/kg 群の雄 2 例で小葉中心部の肝細胞の脂肪変性, 20 mg/kg 群の雌 1 例で単核細胞浸潤が認められたが, 100 mg/kg 群でみられていない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. 対照群では, 雄 1 例で線維化が認められた.

腎臓では, 20 mg/kg 群の雄 3 例及び 100 mg/kg 群の雄 5 例で近位尿細管上皮細胞の軽度の硝子滴沈着が認められた. なお, 20 及び 100mg/kg 群で認められた近位尿細管上皮細胞の硝子滴は, 抗  $\alpha_{2u}$ -globulin 抗体を用いた免疫染色により陽性を示し, その陽性反応は用量の増加により増強する傾向が認められた. また, 100 mg/kg 群の雄 1 例で腎盂の単核細胞浸潤, 100 mg/kg 群の雌 1 例で蛋白円柱が認められたが, いずれも 1 例のみの変化であったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した. さらに, 対照群の雄 4 例, 4 mg/kg 群の雄 3 例, 20 mg/kg 群の雄 2 例並びに 100 mg/kg 群の雄 4 例及び雌 2 例で好塩基性尿細管, 対照群の雄 1 例及び 100 mg/kg 群の雄 3 例で皮質の鉍質沈着, 対照群, 4 及び 20 mg/kg 群の雄各 1 例並びに 4 mg/kg 群の雌 1 例及び 20 mg/kg 群の雌 2 例で髓質の鉍質沈着が認められたが, いずれの変化も対照群と 100 mg/kg 群との間で有意な差は認められなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した. このほか, 4 mg/kg 群の雄 1 例で髓質の嚢胞, 20 mg/kg 群の雄 1 例で髓質の線維化が認められたが, 100 mg/kg 群でみられていない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.

腸間膜リンパ節では, 100 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例で軽度の泡沫細胞集積が認められた.

以上のほか、100 mg/kg 群の雌 1 例で膈粘膜の粘液変性、100 mg/kg 群の雌 1 例で下垂体前葉の嚢胞が認められたが、同群の他の個体に同様の変化がなく、いずれも 1 例のみの変化であったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。また、対照群の雄 1 例及び雌 2 例、100 mg/kg 群の雄 4 例及び雌 2 例で肺動脈の鉍質沈着、対照群の雄 1 例及び雌 4 例並びに 100 mg/kg 群の雄 3 例及び雌 1 例で甲状腺の鰓後体遺残、対照群の雄 3 例及び 100 mg/kg 群の雄 2 例で肺の骨化生、対照群及び 100 mg/kg 群の雄各 1 例で肺胞内の泡沫細胞集積、対照群の雄 1 例及び 100 mg/kg 群の雄 2 例で心筋層の線維化、対照群の雄 2 例及び 100 mg/kg 群の雄 4 例で心臓の単核細胞浸潤、対照群の雄 3 例及び 100 mg/kg 群の雄 2 例で前立腺の単核細胞浸潤が認められたが、いずれの変化も対照群と 100 mg/kg 群との間で有意な差はなかったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。対照群では、雄 2 例及び雌 1 例で膵臓の巣状の腺房萎縮、雄 1 例で膵臓の組織球及び好酸球浸潤、雄 1 例で副腎の巣状の皮質細胞肥大、雄 1 例で眼球網膜の異形成、雌 1 例で膀胱外膜の肉芽腫が認められた。

## 2) 52 週間投与終了時

被験物質投与に起因した変化が、肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節に加えて、脾臓、十二指腸、空腸及び回腸でも認められた。

肝臓では、20 mg/kg 群の雌 4 例、100 mg/kg 群の雄 2 例及び雌全例で小葉中心性の軽度ないし中等度の肝細胞肥大が 13 週間投与終了時の検査に引き続き認められた。これらに加えて、対照群の雄 6 例及び雌 3 例、4 mg/kg 群の雌雄各 1 例、20 mg/kg 群の雄 4 例及び雌 2 例、100 mg/kg 群の雄 5 例及び雌 7 例で小葉辺縁部の肝細胞の軽度ないし中等度の脂肪変性がみられ、対照群と比べて 100 mg/kg 群の雌で有意に増強した。また、対照群の雌雄各 1 例、20 mg/kg 群の雌雄各 2 例、100 mg/kg 群の雄 7 例及び雌 1 例で軽度ないし中等度の胆管の過形成がみられ、対照群と比べて 100 mg/kg 群の雄で有意に増強した。さらに、20 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例並びに 100 mg/kg 群の雄全例及び雌 9 例で類洞に軽度ないし中等度の泡沫細胞集積がみられ、その周囲にはリンパ球浸潤が認められた。このほか、対照群の雌 1 例、4 mg/kg 群の雄 3 例及び雌 1 例、100 mg/kg 群の雄 2 例で軽度ないし中等度の肝細胞の巣状壊死、対照群及び 4 mg/kg 群の雌各 1 例で好塩基性変異細胞巣、100 mg/kg 群の雄 1 例で明細胞性変異細胞巣、対照群の雌 1 例及び 100 mg/kg 群の雄 1 例で血管拡張が認められたが、いずれの変化も対照群と 100 mg/kg 群との間で有意な差はなかったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。また、対照群及び 4 mg/kg 群の雄各 1 例で小葉中心部の肝細胞の脂肪変性、対照群の雄 2 例及び 20 mg/kg 群の雄 3 例で単核細胞浸潤、

4 mg/kg 群の雌 1 例で髄外造血, 4 mg/kg 群の雌 2 例で出血が認められたが, 100 mg/kg 群でみられていない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. 対照群では, 雄 1 例で胆管腫が認められた.

腎臓では, 100 mg/kg 群の雄 3 例で近位尿細管上皮細胞の軽度の硝子滴沈着が引き続き認められた. これに加えて, 対照群の雄 5 例, 4 及び 20 mg/kg 群の雄各 5 例及び雌各 3 例, 100 mg/kg 群の雄 9 例及び雌 5 例で軽度ないし中等度の好塩基性尿細管がみられ, 対照群と比べて 100 mg/kg 群の雌で有意に増強した. このほか, 100 mg/kg 群の雄 1 例で近位尿細管上皮細胞の核肥大が認められたが, 低頻度の変化であったことから, 被験物質投与との関連はないものと判断した. また, 対照群の雄 2 例及び雌 1 例, 4 mg/kg 群の雌雄各 2 例, 20 mg/kg 群の雄 4 例及び雌 3 例並びに 100 mg/kg 群の雄 3 例及び雌 4 例で蛋白円柱, 4 mg/kg 群の雄 1 例, 20 mg/kg 群の雄 4 例及び 100 mg/kg 群の雄 2 例で皮質の鉍質沈着, 対照群の雌 2 例, 4 mg/kg 群の雌 4 例, 20 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 7 例並びに 100 mg/kg 群の雌 4 例で髄質の鉍質沈着, 対照群の雄 1 例並びに 4 及び 20 mg/kg 群の雌各 2 例で腎盂の鉍質沈着が認められたが, いずれの変化も対照群と 100 mg/kg 群との間で有意な差はなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した. さらに, 対照群の雌雄各 1 例, 4 mg/kg 群の雌雄各 2 例並びに 20 mg/kg 群の雌 1 例で腎盂移行上皮の過形成, 対照群の雌雄各 1 例並びに 4 及び 20 mg/kg 群の雄各 3 例で腎盂の単核細胞浸潤, 対照群の雄 1 例, 4 mg/kg 群の雄 2 例並びに 20 mg/kg 群の雄 1 例で皮質の単核細胞浸潤, 対照群の雌雄各 1 例, 4 mg/kg 群の雄 2 例並びに 20 mg/kg 群の雄 3 例で腎盂腔の好中球滲出, 20 mg/kg 群の雌 1 例で遠位尿細管の拡張, 20 mg/kg 群の雌 1 例で腎盂の出血が認められたが, いずれの変化も 100 mg/kg 群でみられていない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考えられた. 対照群では, 腎盂拡張及び髄質の嚢胞が雌各 1 例で認められた.

腸間膜リンパ節では, 20 mg/kg 群の雄 5 例及び雌 3 例, 並びに 100 mg/kg 群の雌雄全例で軽度ないし重度の泡沫細胞集積が引き続き認められた.

脾臓では, 20 mg/kg 群の雄 1 例及び 100 mg/kg 群の雌雄各 4 例で脾臓の赤脾髄及び白脾髄の軽度ないし中等度の泡沫細胞集積が認められた. このほか, 4 mg/kg 群の雌 2 例及び 20 mg/kg 群の雌 1 例で髄外造血が認められたが, 100 mg/kg 群でみられていない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. 対照群では, 雌 1 例で被膜の嚢胞が認められた.

十二指腸では, 100 mg/kg 群の雌雄各 1 例, 空腸では 100 mg/kg 群の雄 8 例及び雌 6 例で粘膜固有層の軽度の泡沫細胞集積が認められた. 回腸では, 100 mg/kg 群の雄 6 例及び雌 1

例で粘膜固有層の軽度の泡沫細胞集積, 100 mg/kg 群の雄 3 例及び雌 1 例でパリエル板の軽度の泡沫細胞集積が認められた。

以上のほか, 100 mg/kg 群では, 脾臓の肝細胞化生, 前立腺の間質の線維化, 皮下の単核細胞浸潤, 下垂体前葉の嚢胞, 下垂体前葉の腺腫及び眼球角膜の鉍質沈着が雄各 1 例で見られ, 子宮内膜の嚢胞, 乳腺の腺腫, 下垂体後葉の異所性組織, 眼球網膜の異形成及び眼球網膜の巣状萎縮が雌各 1 例で認められた。また, 剖検時に後肢が腫大していた 100 mg/kg 群の雌 1 例では当該部に仮骨形成が認められた。これらの変化はいずれも 1 例のみの変化であったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

上記に加えて, 対照群の雄 10 例及び雌 9 例並びに 100 mg/kg 群の雌雄全例で胸腺の萎縮が認められた。また, 対照群の雄 5 例及び雌 2 例並びに 100 mg/kg 群の雌雄各 3 例で腺胃の腺腔拡張, 対照群の雌 3 例及び 100 mg/kg 群の雄 1 例で脾臓の巣状の腺房萎縮, 対照群の雌雄各 1 例及び 100 mg/kg 群の雄 2 例で肺胞内の泡沫細胞集積, 対照群の雄 4 例及び 100 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例で肺動脈の鉍質沈着, 対照群の雄 6 例及び雌 1 例並びに 100 mg/kg 群の雄 5 例及び雌 1 例で心臓の単核細胞浸潤, 対照群の雌 8 例並びに 100 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 6 例で乳腺の腺房/導管の拡張, 対照群の雌雄各 2 例及び 100 mg/kg 群の雌 3 例で甲状腺の鰓後体遺残, 対照群の雄 1 例及び 100 mg/kg 群の雌 1 例で C 細胞の巣状過形成, 対照群の雄 1 例及び雌 2 例並びに 100 mg/kg 群の雄 1 例で下垂体前葉の巣状過形成, 対照群の雌 6 例並びに 100 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 3 例で副腎皮質細胞の巣状過形成が認められた。さらに, 対照群の雄 2 例及び 100 mg/kg 群の雄 1 例で脾臓の巣状の腺房細胞過形成, 対照群及び 100 mg/kg 群の雄各 5 例で心筋層の線維化, 対照群及び 100 mg/kg 群の雄各 1 例で前立腺の単核細胞浸潤, 対照群の雌 3 例及び 100 mg/kg 群の雌 2 例で子宮腺上皮細胞の扁平上皮化生, 対照群の雌 4 例及び 100 mg/kg 群の雌 1 例で膣粘膜の粘液変性, 対照群の雌 7 例及び 100 mg/kg 群の雌 8 例で副腎の血管拡張が認められた。これらの他, 剖検時に後肢の胼胝がみられた例では, 当該部に潰瘍も認められた。しかし, いずれの変化も対照群と 100 mg/kg 群との間で有意な差はなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。対照群では, 脾臓の腺房細胞の好塩基性巣及び肺の骨化生が雄各 2 例, 脾臓の出血, 精巣の精細管萎縮及び間質の浮腫, 精巣上体の精子減少, 下垂体後葉のグリオシス, 副腎の巣状の皮質細胞肥大及び皮膚の角化棘細胞腫が雄各 1 例で見られ, 脾臓の多発性動脈炎及び下垂体のラトケ嚢の出血が雌各 1 例で認められた。

### 3) 途中剖検例及び切迫屠殺例

#### 【死亡例】



- No.564 (100 mg/kg 群, 雄) では, 胸腔内に横紋筋肉腫が認められた。また, 腫瘍細胞にPTAH染色で陽性を示す横紋が認められた。さらに, 生存例と同様に, 被験物質投与に起因した変化として, 小葉中心性の中等度の肝細胞肥大及び腸間膜リンパ節の中等度の泡沫細胞集積が認められた。このほか, 後大静脈腹部の血栓, 肝臓の出血, 肺の水腫, 脾臓の髓外造血及び甲状腺の鰓後体遺残が認められた。
- No.551 (20 mg/kg 群, 雄) では, 肺の水腫が認められたことから, 循環障害が示唆されたが, 死因を特定するには至らなかった。また, 生存例と同様に, 被験物質投与に起因した変化として, 腸間膜リンパ節の軽度の泡沫細胞集積が認められた。また, 小葉辺縁部の肝細胞の脂肪変性, 下垂体前葉の巣状過形成, 心臓の単核細胞浸潤及び心筋層の線維化, 胸腺の出血, 肺動脈の鉍質沈着及び後肢の潰瘍が認められた。
- No.554 (20 mg/kg 群, 雄) では, 下垂体の腺癌が認められた。また, 肺の水腫及び肺動脈の鉍質沈着, 胸腺の出血, 小葉中心部の肝細胞の脂肪変性, 甲状腺の鰓後体遺残が認められた。
- No.651 (20 mg/kg 群, 雌) では, 上皮性胸腺腫が認められた。このほか, 心外膜の線維化, 肺の水腫及び肺動脈の鉍質沈着及び脾臓の萎縮が認められた。
- No.536 (4 mg/kg 群, 雄) では, 肺の水腫が認められたことから, 循環障害が示唆されたが, 死因を特定するには至らなかった。また, 小葉辺縁部の肝細胞の脂肪変性, 副腎の皮質細胞の巣状過形成, 胸腺の出血, ハーダー腺のリンパ球浸潤, 肺動脈及び坐骨神経の小動脈の鉍質沈着及び後肢の潰瘍が認められた。

#### 【途中剖検例】

- No.537 (4 mg/kg 群, 雄) では, 骨髄性白血病が認められた。また, 脾臓, 膀胱粘膜及び脊髄の出血, 膀胱の移行上皮細胞の過形成, 腎臓の近位尿細管の細胞残渣及び鉍質沈着, 遠位尿細管の拡張, 肝細胞の広範性壊死, 肺の水腫, 副腎束状帯の皮質細胞の単細胞壊死及び胸腺の萎縮が認められた。

## 考察

1,1-ビス[tert-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンを雌雄ラットに0(対照群), 4, 20 および 100 mg/kg の用量で13または52週間反復経口投与した。

一般状態, 体重及び摂餌量では, 投与期間を通して, 被験物質投与に起因にした変化は認めら

れなかった。

被験物質投与に起因した変化が、13週間投与終了時の肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節にみられ、さらに52週間投与終了時では肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節に加えて脾臓、十二指腸、空腸及び回腸でも認められた。

肝臓では、病理組織学的検査で13及び52週間投与終了時の20 mg/kg以上の群の雌雄で小葉中心性の肝細胞肥大が観察され、100 mg/kg群の雌では13週間投与終了時に比べて52週間投与終了時でその程度が増強していた (Photo. 1~3)。肝細胞の肥大は、本被験物質をラットに28日間反復投与した毒性試験及びマウスに13週間反復投与した毒性試験でも報告されており、薬物代謝酵素の誘導が示唆されている<sup>1), 2)</sup>。本試験で認められた肝細胞の肥大も、弱好酸性の均一な細胞質を有していることから、滑面小胞体の増加、すなわち薬物代謝酵素の誘導を反映したものと考えられた。さらに、52週間投与終了時の100 mg/kg群の雄で胆管の過形成が、雌で小葉辺縁部の肝細胞の脂肪変性が対照群と比較して有意に増強していた (Photo. 3, 4)。これらに加えて、剖検では52週間投与終了時の20 mg/kg以上の群の雄及び100 mg/kg群の雌で肝臓の肥大がみられ、器官重量では13週間投与終了時の100 mg/kg群の雄及び20 mg/kg以上の群の雌で肝臓重量の高値、52週間投与終了時の4 mg/kg群の雌で肝臓の相対重量、20 mg/kg群の雌並びに100 mg/kg群の雌雄で肝臓の絶対及び相対重量の高値が認められた。これらの変化は、被験物質を長期投与することによる肝機能への影響を示唆するものと考えられた。さらに、100 mg/kg群の雄でみられた甲状腺の絶対及び相対重量の高値では、病理組織学的検査で何ら変化がみられなかったものの、前述のように肝臓の薬物代謝酵素の誘導が示唆されていることから、この薬物代謝酵素の誘導に伴った変化と考えられた。また、後述する血液学的検査でみられた100 mg/kg群の雄の血液凝固系の変動、血液生化学的検査でみられた20 mg/kg群の雌及び100 mg/kg群の雌雄の蛋白系及び脂質系パラメータの変動は肝臓でみられた変化に伴ったものと考えられた。

腎臓では、病組織学的検査で13週間投与終了時の20 mg/kg以上の群の雄、52週間投与終了時の100 mg/kg群の雄で近位尿細管上皮細胞の硝子滴沈着が観察され (Photo. 5)、近位尿細管上皮細胞の硝子滴沈着がみられた箇所に抗 $\alpha_{2u}$ -globulinの存在が確認された。 $\alpha_{2u}$ グロブリンの蓄積は、雄性ラットに特有な変化であり、ヒトでは発現し得ないことから、近位尿細管でみられた硝子滴沈着については、被験物質投与との関連はない変化と判断した。一方、好塩基性尿細管は、13週間投与終了時に対照群と100 mg/kg群との間で有意な差はなかったものの、52週間投与終了時には100 mg/kg群の雌で有意に増強した (Photo. 6)。好塩基性尿細管は、先に実施した28日間反復投与の毒性試験では雄のみに認められ、尿細管の再生像と考えられている<sup>1)</sup>。しかし、本試験では好塩基性尿細管の増強は雌のみに発現しており、このことは $\alpha_{2u}$ -globulinを介さない経路での

腎臓への影響があることを示唆するものと考えられたが、前駆病変等は認められず、発生機序を特定することはできなかったが被験物質を長期投与することによる腎臓への影響を示唆するものとかんがえられた。これらに加えて、13及び52週間投与終了時の器官重量で、100 mg/kg 群の雌で腎臓の絶対または相対重量の高値が認められ、この変化も被験物質の長期投与を示唆した変化と考えられた。

腸間膜リンパ節では、病理組織学的検査で13週間投与終了時の100 mg/kg 群の雌雄、52週間投与終了時の20 mg/kg 以上の群の雌雄で泡沫細胞集積がみられ、13週間投与終了時に比べて52週間投与終了時で発現頻度の増加及び程度の増強が認められた (Photo. 7, 8)。また、52週間投与終了時には、同様の泡沫細胞集積が20 mg/kg 以上の群の雌雄で肝臓の類洞、脾臓の赤脾髄及び白脾髄、100 mg/kg 群の雌雄で小腸 (十二指腸、空腸及び回腸) の粘膜固有層及びパイエル板でも観察された (Photo. 4, 9, 10)。さらに、脾臓の赤脾髄及び白脾髄に中等度の泡沫細胞の集積がみられた100 mg/kg 群の雄1例では、剖検で脾臓の肥大が認められた。本被験物質はトウモロコシ油を媒体として経口投与されていることから、被験物質が食物脂質の吸収及び代謝と同様な経路、すなわち小腸で吸収され、リンパ管を経て静脈に流れ込み、組織や器官に運ばれるもの<sup>3), 4)</sup>と推測された。一連の泡沫細胞集積については、前述した吸収及び代謝の経路をたどるように観察されたことから、被験物質が小腸で吸収されていること、その後リンパ行性あるいは血行性に運ばれた器官で細胞内に取り込まれて処理されていることを反映しているものと考えられた。泡沫細胞集積の発現が13週間投与終了時と比べて52週間投与終了時で増強していた。なお、肝臓の泡沫細胞集積周囲のリンパ球浸潤については、傷害的意義は不明であった。

上記の他、血液学的検査では、52週間投与終了時の100 mg/kg 群の雄で白血球数並びに白血球形態検査の好中球数、リンパ球数、好塩基球数、単球数及び非染色性大型細胞数の高値、MCV、MCH、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の低値、PT及びAPTTの延長が認められた。また、血液生化学的検査では、13週間投与終了時の100 mg/kg 群の雄で $\beta$ -グロブリン比の高値及びクロールの低値、同群の雌でA/G比及びアルブミン比の低値、 $\beta$ -グロブリン比及び総コレステロールの高値がみられ、20 mg/kg 群の雌で総コレステロールの高値が認められた。さらに、52週間投与終了時の100 mg/kg 群の雄でA/G比及びアルブミン比の低値、 $\alpha_2$ -グロブリン比、 $\beta$ -グロブリン比及びALTの高値がみられ、同群の雌でA/G比、アルブミン比及びナトリウムの低値、総蛋白質、 $\alpha_1$ -グロブリン比、 $\beta$ -グロブリン比、総コレステロール及びリン脂質の高値が認められた。なお、尿検査では、13及び52週間投与終了時の検査ともに、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下における 1,1-ビス[tert-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシク

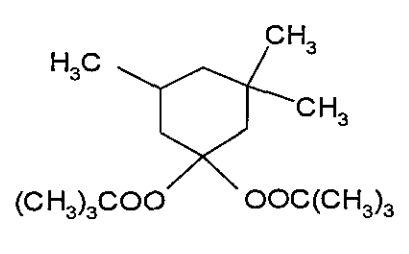
ロヘキサンの無影響量 (NOEL) は雄では 4 mg/kg/day, 雌では 4 mg/kg/day 未満と判断した。

## 文 献

- 1) 畔上二郎ほか (2000) : 1,1-ビス[*tert*-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験 (回復 14 日間), 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所.
- 2) 三井雅之ほか (1992) : 1,1-Bis(*t*-butylperoxy) 3,3,5-trimethyl cyclohexane のマウスにおける 13 週間亜慢性毒性試験, 衛生試験所報告, 110: 42-48.
- 3) 坂東武彦ほか, 監訳 (2003) : 消化器系, カラー基本生理学, pp.296-341. 西村書店, 東京.
- 4) 真島英信 (1978) : 代謝, 生理学, pp.447-469. 文光堂, 東京.

6-2. 1,1-ビス(tert-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの 52 週間反復投与毒性試験

1. 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	1,1-ビス[tert-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン			
構造式または示性式	 <p>Lot. No. 2X01</p>	物理化学的性状	分子量(式量)	302.46
			常温における性状	無色透明の液体
試験に供した 化学物質の純度	98.8 wt%	溶解度	安定性 (光, 熱, 光など)	通常取り扱いにおいては安定
			融点	-40℃以下
不純物の名称および濃度	不明		沸点	測定不可
			蒸気圧	データなし
			分配係数	データなし
			水	不溶
			アセトン	易溶
			DMSO	易溶

その他(別紙参照)

- 有害性情報(急性毒性など)
- その他の物理化学的性質(pH, pKaなど)
- 溶媒中の安定性
- 取り扱い上の留意点(危険性, 有害性など)
- 廃棄方法

2. 急性毒性試験, 28日間反復投与毒性試験

試験No.	試験の種類および期間	動物種	1群当たりの動物数	投与経路	投与量(mg/kg)	LD <sub>50</sub> 値又はNOEL*(mg/kg)	実験場所
1	急性経口投与毒性試験 (試験番号: A-98-039) (1000, 2000 mg/kg)	ラット	雌雄各5匹	経口	1000 2000	LD <sub>50</sub> 値; 雌雄とも2000 mg/kg以上	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
2	28日間反復経口投与毒性試験 (試験番号: C-98-017) (100, 300, 1000 mg/kg)  一般状態 体重 摂餌量 尿検査 血液学的検査 血液生化学的検査 器官重量 剖検 病理組織学的検査	ラット	雌雄各5匹	経口	0 100	雌雄: 異常なし. 雄: 近位尿細管に好酸性細胞質内封入体の出現. 雌: 流涎. アルブミン濃度及びA/G比の低下. 肝臓の相対重量の増加, 副腎の絶対及び相対重量の増加. 小葉中心性の肝細胞肥大, 門脈周囲性の脂肪化, 束状帯細胞の細胞質肥大.	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

## 2. 急性毒性試験, 28日間反復投与毒性試験 (続き)

試験 No.	試験の種類 および期間	動物種	1群当たり の動物数	投与 経路	投与量 (mg/kg)	LD <sub>50</sub> 値又はNOEL* (mg/kg)	実験場所
2	28日間反復経口投与 毒性試験 (試験番号: C-98-017) (100, 300, 1000 mg/kg)	ラット	雌雄各5匹	経口	300	雄: 流涎. トリグリセライドの低下. 肝臓及び腎臓の相対重量の増加. 肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大. 腎臓の近位尿細管に好酸性細胞質内封入体の出現.  雌: 流涎. A/G比の低下, 総コレステロールの上昇. 肝臓の絶対及び相対重量の増加, 腎臓の絶対重量の増加, 副腎の絶対重量の増加. 肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大及び門脈周囲性の脂肪化. 副腎の束状帯細胞の細胞質肥大.	
					1000	雄: 流涎. 摂餌量の低値(投与1~2週). PT及びAPTTの延長. GPT活性の上昇, ブドウ糖濃度及びトリグリセライドの低下. 肝臓の絶対及び相対重量の増加, 腎臓の相対重量の増加. 肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大. 腎臓の近位尿細管に好酸性細胞質内封入体の出現. (回復) ヘマトクリット値の減少, 平均赤血球色素濃度の上昇. A/G比の低下. 肝臓, 腎臓及び副腎の相対重量の増加.  雌: 流涎. 摂餌量の低値(投与1~2週). PT及びAPTTの延長, 血色素量の減少. A/G比の低値, 総蛋白濃度, GPT活性及びγ-GTPの上昇, 総コレステロールの上昇. 肝臓, 腎臓及び副腎の絶対及び相対重量の増加. 肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大及び門脈周囲性の脂肪化. 副腎の束状帯細胞の細胞質肥大. (回復) 血色素量及びヘマトクリット値の低下. A/G比の低下傾向. 肝臓及び腎臓の相対重量の増加.	

## 3. 52週間反復投与毒性試験

被験物質投与期間	(雄) 自 2003年7月30日 至 2004年7月27日
	(雌) 自 2003年7月31日 至 2004年7月28日
使用動物・系統	ラット Crj:CD (SD) IGS 1群当たりの動物数 対照, 低用量, 中間用量, 高用量: 雌雄各20匹
投与経路	強制経口投与 投与13週終了時の検査動物数 対照, 低用量, 中間用量, 高用量/雌雄各10匹
被験物質の純度	98.8 wt% 投与52週終了時の検査動物数 対照, 低用量, 中間用量, 高用量/雌雄各10匹

解剖時期	投与13週終了時								投与52週終了時							
	対照		低用量		中間用量		高用量		対照		低用量		中間用量		高用量	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
死亡	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	1	0	0
切迫屠殺	0	0	1 <sup>1)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
一般状態																
瞳孔異常	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
呼吸緩徐	0	0	1 <sup>1)</sup>	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0
活動性低下	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	1	0	1 <sup>2)</sup>	0	0
下腹部汚染	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0
鼻周囲汚染	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
よろめき歩行	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0
赤色尿	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0
皮膚蒼白	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	1	0	0	0	0
四肢の腫脹(後肢の腫脹)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
肝臓	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	5 <sup>2)</sup>	2	5 <sup>2)</sup>	1	6	3
腫瘍	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
立毛	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0
腹式呼吸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0
眼球蒼白	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
体温低下	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0
体重																
摂餌量																
投与57日							△									
投与85日							△									
尿検査																
尿pH(アルカリ性側への移行)													▽			
血液学的検査																
白血球															▲	
ヘモグロビン													▽			▼
ヘマトクリット値												▽				▽
MCV(平均赤血球容積)															▼	
MCH(平均赤血球色素量)															▽	
PT(プロトロンビン時間)															▲	▽
APTT(活性化部分トロンボプラスチン時間)															▲	
好中球数															▲	
リンパ球数															▲	
好塩基球数															△	
単球数															▲	
非染色性大型細胞数							△								▲	
血液生化学的検査																
総蛋白質																△
A/G比															▼	▼
α <sub>1</sub> -グロブリン																△
α <sub>2</sub> -グロブリン															△	
β-グロブリン							▲	▲							▲	▲
アルブミン															▼	
総ビリルビン								▽								
ALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)																△
総コレステロール			36			△		△								▲
リン脂質																△
ナトリウム																▼
クロール								▽								

解剖時期	投与13週終了時								投与52週終了時									
	群		対照		低用量		中間用量		高用量		対照		低用量		中間用量		高用量	
	投与量 (mg/kg)		0		4		20		100		0		4		20		100	
性		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
剖検所見																		
食道																		
粘膜の陥凹	+	0	0	1 <sup>1)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
胃																		
腺胃粘膜の暗赤色点	+	0	0	1 <sup>1)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
肝臓																		
暗赤色斑	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	
肥大	+	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	2 <sup>2)</sup>	0	4	3	
灰白色腫瘤	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
褪色	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	
肺																		
暗赤色化	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	
胸腺																		
小型化	+	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	9 <sup>2)</sup>	10	10 <sup>2)</sup>	9	10	10	
暗赤色化	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	
灰白色腫瘤	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	
心嚢との癒着	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	
動脈(後大動脈腹部)																		
血栓	+	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
心臓																		
暗赤色の心嚢水の貯留	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	
脾臓																		
灰白色腫瘤	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
脾臓																		
肥大	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	1	0	0	1	0	
嚢胞	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
褪色	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	
破裂	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	
血様物の付着	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	
腎臓																		
表面の粗造	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
腎盂拡張	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
膀胱																		
膀胱粘膜の暗赤色斑	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	
暗赤色尿の貯留	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	
精巣																		
肥大	+	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	
軟化	+	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA	0	NA	
小型化	+	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	
精巣上体																		
淡黄色結節	+	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	
子宮																		
肥大	+	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	
子宮内膜の嚢胞	+	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	1	
乳腺																		
乳汁貯留	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	1	1	0	3	0	3	
下垂体																		
肥大	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
暗赤色点	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	
暗赤色腫瘤	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
灰白色腫瘤	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	
大脳との癒着	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	
甲状腺																		
灰白色結節	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
副腎																		
褐色点	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1 <sup>2)</sup>	1	0	2	0	1	
肥大	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
褐色結節	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	

数値: 発現例数, NA: 非適用, +: 軽度, ++: 中等度, 1): 投与過誤動物を含む, 2): 切迫・途中死亡動物含む.



解剖時期	投与13週終了時								投与52週終了時									
	群		対照		低用量		中間用量		高用量		対照		低用量		中間用量		高用量	
	投与量 (mg/kg)		0		4		20		100		0		4		20		100	
性		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
剖検所見(続き)																		
外皮系																		
皮下の灰白色腫瘤	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	0	2	0	3	
頸部皮下の浮腫様変化	+	0	0	1 <sup>1)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
眼球																		
瞳孔異常	+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
胸腔																		
灰白色腫瘤	+	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
暗赤色の心嚢水の貯留	+	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
四肢																		
後肢の腫大	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
後肢の肝臓	+	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	3 <sup>2)</sup>	2	3 <sup>2)</sup>	1	4	2	
器官重量																		
甲状腺				-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	△	-	
肝臓				-	-	-	-	▲	▲			-	-	-	△	△	▲	
腎臓				-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	-	▲	
体重比器官重量																		
甲状腺				-	-	-	-	-	△			-	-	-	-	△	-	
肺				-	-	-	-	-	△			-	-	-	-	-	-	
肝臓				-	-	-	-	▲	▲			-	△	-	△	▲	▲	
腎臓				-	-	-	-	-	△			-	-	-	-	-	-	
病理組織学的所見																		
舌		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR	
食道		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR	
胃																		
腺胃の腺腔拡張		0	0	*	*	*	*	0	0	5	2	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>2)</sup>	0	3	3	
自己融解		0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	1 <sup>3)</sup>	*	2 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	0	0	
十二指腸																		
粘膜固有層の泡沫細胞集積	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>2)</sup>	0	1	1	
自己融解		0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	1 <sup>3)</sup>	*	2 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	0	0	
空腸																		
粘膜固有層の泡沫細胞集積	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>2)</sup>	0	8	6	
自己融解		0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	1 <sup>3)</sup>	*	2 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	0	0	
回腸																		
粘膜固有層の泡沫細胞集積	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>2)</sup>	0	6	1	
パイエル板の泡沫細胞集積	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>2)</sup>	0	3	1	
自己融解		0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	1 <sup>3)</sup>	*	2 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	0	0	
盲腸																		
自己融解		0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	NR	NR	1 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	1 <sup>3)</sup>	NR	0	
結腸																		
自己融解		0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	NR	NR	1 <sup>3)</sup>	*	2 <sup>3)</sup>	1 <sup>3)</sup>	NR	0	
直腸																		
自己融解		0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	NR	NR	1 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	1 <sup>3)</sup>	NR	0	
顎下腺																		
		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR	
舌下腺																		
		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR	
耳下腺																		
		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR	
肝臓																		
小葉中心部の肝細胞の脂肪変性	+	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	
小葉辺縁部の肝細胞の脂肪変性	+	3	1	3	1	5	2	3	4	5	3	1	1	3	2	3	3	
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 <sup>2)</sup>	0	2 <sup>2)</sup>	0	2	4	
	総数	3	1	3	1	5	2	3	4	6	3	2 <sup>2)</sup>	1	5 <sup>2)</sup>	2	5	7	
肝細胞の巣状壊死	+	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	2	1	0	0	2	0	
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	総数	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	3	1	0	0	2	0	
肝細胞の広範性壊死	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	
小葉中心性の肝細胞肥大	+	0	0	0	0	0	2	2	8	0	0	0	0	0	4	2	0	
	++	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0	10	
	総数	0	0	0	0	0	2	3 <sup>2)</sup>	9	0	0	0	0	0	4	2	10	

数値: 発現例数, NR: 異常なし, \*: 検査せず, +: 軽度, ++: 中等度, 2): 切迫・途中死亡動物含む, 3): 切迫・途中死亡動物のみ検査

解剖時期	投与13週終了時								投与52週終了時									
	群		対照		低用量		中間用量		高用量		対照		低用量		中間用量		高用量	
	投与量 (mg/kg)		0		4		20		100		0		4		20		100	
	性		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
病理組織学的所見(続き)																		
肝臓(続き)																		
胆管の過形成	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	2	5	1	
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	
	総数	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	2	7	1	
髓外造血	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
好塩基性変異細胞巢	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
明細胞性変異細胞巢	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
血管拡張	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
出血	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
	++	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	総数	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
単核細胞浸潤	+	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	
類洞の泡沫細胞集積	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	7	
(周囲にリンパ球浸潤)	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	2	
	総数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	10	9	
胆管腫	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
繊維化	+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
脾臓																		
巣状の腺房萎縮	+	2	1	*	*	*	*	0	0	0	3	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	1	0	
組織球及び好酸球浸潤	+	1	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	0	
巣状の腺房細胞過形成	+	0	0	*	*	*	*	0	0	2	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	1	0	
腺房細胞の好塩基性巢	+	0	0	*	*	*	*	0	0	2	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	0	
肝細胞の化生	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	1	0	
出血	+	0	0	*	*	*	*	0	0	1	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	0	
多発性動脈炎	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	1	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	0	
自己融解	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	*	0	0	
気管		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR	
肺																		
骨化成	+	3	0	*	*	*	*	2	0	2	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	0	0	
肺胞内の泡沫細胞集積	+	1	0	*	*	*	*	1	0	1	1	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	2	0	
肺動脈の鉍質沈着	+	1	2	*	*	*	*	4	2	4	0	1 <sup>3)</sup>	*	2 <sup>3)</sup>	1 <sup>3)</sup>	2	1	
浮腫	+	0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	2 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	1 <sup>3)</sup>	0	0	
	++	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	0	0	
	総数	0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	2 <sup>3)</sup>	*	2 <sup>3)</sup>	1 <sup>3)</sup>	0	0	
胸腺																		
萎縮	+	NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	7	8	1 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	6	8	
	++									3	1	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	4	2	
	総数									10	9	1 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	10	10	
出血	+									0	0	1 <sup>3)</sup>	*	2 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	0	0	
上皮性胸腺腫	+									0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	1 <sup>2)</sup>	0	0	
下顎部リンパ節																		
腸管膜リンパ節		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR	
泡沫細胞集積	+	0	0	*	*	0	0	2	1	0	0	0	0	6 <sup>2)</sup>	3	3	4	
	++	0	0	*	*	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	6	6	
	+++	0	0	*	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	総数	0	0	*	*	0	0	3 <sup>2)</sup>	1	0	0	0	0	6 <sup>3)</sup>	3 <sup>3)</sup>	10	10	
脾臓																		
髓外造血	+	0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	
	++	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	総数	0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	
被膜の囊胞	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
白脾髄の泡沫細胞集積	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0	0	1	0	3	4	
	++	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	総数	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0	0	1	0	4	4	
赤脾髄の泡沫細胞集積	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0	0	1	0	3	4	
	++	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	総数	0	0	39	*	*	*	0	0	0	0	0	0	1	0	4	4	
出血	++	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	
萎縮	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	

解剖時期	投与13週終了時								投与52週終了時									
	群		対照		低用量		中間用量		高用量		対照		低用量		中間用量		高用量	
	投与量 (mg/kg)		0		4		20		100		0		4		20		100	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
病理組織学的所見(続き)																		
骨髓(大腿骨)	NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR		
胸骨(骨髓)	NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR		
全器官及び組織																		
骨髓性白血病	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1 <sup>3)</sup>	*	*	*	*	*	*
心臓																		
単核細胞浸潤	+	2	0	*	*	*	*	4	0	6	1	0 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	5	1	
心筋層の繊維化	+	1	0	*	*	*	*	2	0	5	0	0 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	4	0	
	++	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	1	0	
	総数	1	0	*	*	*	*	2	0	5	0	0 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>	5	0	
心外膜の繊維化	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	1 <sup>3)</sup>	0	0	
大動脈										NR	NR							
血栓	+	0	0	*	*	*	*	1 <sup>3)</sup>	0			0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*			
腎臓																		
腎盂移行上皮の過形成	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	0	1	0	0	
好塩基性尿細管	+	4	0	3	0	2	0	4	2	4	0	4	3	5	3	7	5	
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0	
	総数	4	0	3	0	2	0	4	2	5	0	5	3	5	3	9	5	
近位尿細管上皮細胞の核肥大	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
近位尿細管上皮細胞の硝子滴沈着	+	0	0	0	0	3	0	5	0	0	0	0	0	0	0	3	0	
近位尿細管上皮細胞の細胞残さ	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	
近位尿細管上皮細胞の鉍質沈着	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	
蛋白円柱	+	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	2	4	3	3	4	
遠位尿細管の拡張	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>2)</sup>	0	0	1	0	0	
腎盂拡張	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
髓質の嚢胞	+	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
腎盂の出血	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
腎盂の単核細胞浸潤	+	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	3	0	3	0	0	0	
皮質の単核細胞浸潤	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	
腎盂腔の好中球滲出	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	3	0	0	0	
髓質の繊維化	+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
腎盂の鉍質沈着	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	2	0	0	
皮質の鉍質沈着	+	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	2	0	
髓質の鉍質沈着	+	1	0	1	1	1	2	0	0	0	2	0	4	1	7	0	4	
膀胱																		
外膜の肉芽腫	+	0	1	*	*	*	*	0	0	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR	
粘膜の出血	+	0	0	*	*	*	*	0	0	NR	NR	1 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR	
移行上皮細胞の過形成	+	0	0	*	*	*	*	0	0	NR	NR	1 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR	
精巣		NR	NA	*	NA	*	NA	NR	NA									
精細管萎縮	+++									1	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	0	NA	
間質の浮腫	+++									1	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	0	NA	
精巣上体		NR	NA	*	NA	*	NA	NR	NA									
精子減少	++									1	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	*	NA	0	NA	
前立腺																		
単核細胞浸潤	+	3	NA	*	NA	*	NA	2	NA	1	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	1	NA	
間質の繊維化	+	0	NA	*	NA	*	NA	0	NA	0	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	1	NA	
精囊		NR	NA	*	NA	*	NA	NR	NA	NR	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	0 <sup>3)</sup>	NA	NR	NA	
卵巣		NA	NR	NA	*	NA	*	NA	NR	NA	NR	NA	*	NA	*	NA	NR	
子宮		NA	NR	NA	*	NA	*	NA	NR	NA	NR	NA	*	NA	*	NA	NR	
腺上皮細胞の扁平上皮化生	+									NA	3	NA	*	NA	*	NA	2	
内膜の嚢胞	+									NA	0	NA	*	NA	*	NA	1	
膣																		
粘膜の粘液変性	+	NA	0	NA	*	NA	*	NA	1	NA	4	NA	*	NA	*	NA	1	
乳腺		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR									
腺房/導管の拡張	+									0	2	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	1	3	
	++									0	6	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	3	
	総数			40						0	8	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	1	6	
腺腫	+									0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	1	

解剖時期 群	投与13週終了時								投与52週終了時								
	対照		低用量		中間用量		高用量		対照		低用量		中間用量		高用量		
	0		4		20		100		0		4		20		100		
投与量 (mg/kg)	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
病理組織学的所見(続き)																	
下垂体																	
前葉細胞の巣状過形成	+	0	0	*	*	*	*	0	0	1	2	0 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	*	1	0
前葉の嚢胞	+	0	0	*	*	*	*	0	1	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	1	0
ラトケ囊の出血	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	1	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	0
後葉のグリオシス	+	0	0	*	*	*	*	0	0	1	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	0
後葉の異所性組織	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	1
前葉の腺腫	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	1	0
腺癌	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	*	0	0
甲状腺																	
C細胞の巣状過形成	+	0	0	*	*	*	*	0	0	1	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	1
鰓後体遺残	+	1	4	*	*	*	*	4 <sup>2)</sup>	1	2	2	0 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	*	0	3
上皮小体																	
副腎																	
巣状の皮質細胞肥大	+	1	0	*	*	*	*	0	0	1	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	0
皮質細胞の巣状過形成	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	6	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	1	3
血管拡張	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	7	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	8
副腎(続き)																	
束状帯皮質細胞の単細胞壊死	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	1 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	0
皮質細胞の巣状過形成	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	1 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	0
大脳																	
小脳																	
延髄																	
脊髄																	
出血																	
視神経		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR
坐骨神経		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
小動脈の鉍質沈着												1 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*		
眼																	
網膜の異形成	+	1	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	0
網膜の巣状萎縮	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	1
網膜の異形成	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	1
角膜の鉍質沈着	+	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	1	0
ハーダー腺																	
リンパ球浸潤												1 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*		
大腿二頭筋		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR
胸骨		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR
大腿骨		NR	NR	*	*	*	*	NR	NR	NR	NR	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	NR	NR
胸腔内																	
横紋筋肉腫	+	0	0	*	*	*	*	1 <sup>2)</sup>	0			0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*		
外皮																	
皮下の単核細胞浸潤	+									0	0	*	*	*	*	1	0
皮膚の角化棘細胞腫	+									1	0	*	*	*	*	0	0
その他																	
後肢の仮骨形成	+									0	0	0 <sup>3)</sup>	*	0 <sup>3)</sup>	*	0	1
後肢の潰瘍	+									4	2	1 <sup>3)</sup>	*	1 <sup>3)</sup>	*	4	2
数値: 発現例数, NR: 異常なし, *: 検査せず, +: 軽度, 2): 切迫・途中死亡動物含む, 3): 切迫・途中死亡動物のみ検査																	
NOAEL (mg/kg)	雄, 4 mg/kg								雌, 4 mg/kg未満								
NOAELの推定根拠とした変化	雄では, 20 mg/kg群で肝細胞の肥大, 肝臓の類洞の軽度ないし中等度の泡沫細胞集積がみられ, その周囲にはリンパ球浸潤が認められた. また, 腎臓では近位尿管上皮細胞の軽度の硝子滴沈着が認められた. さらに, 腸間膜リンパ節で泡沫細胞集積, 脾臓の赤脾髄及び白脾髄の軽度の泡沫細胞集積が認められた. 雌では, 4 mg/kg群で肝臓の相対重量高値が認められた.																

## 要約

1,1-ビス[tert-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンを雌雄ラットに0(対照群), 4, 20及び100 mg/kgの用量で13週または52週間反復経口投与した。

### 1. 一般状態

投与期間を通して、全例で被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

### 2. 体重

投与期間を通して、各被験物質投与群で対照群とほぼ同様の増加推移を示した。

### 3. 摂餌量

投与期間を通して、各被験物質投与群で被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

### 4. 尿検査

投与13及び52週の検査ともに、各被験物質投与群で被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

### 5. 血液学的検査

13週間投与終了時の検査では、各被験物質投与群で被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

52週間投与終了時の検査では、100 mg/kg群の雄で白血球数並びに白血球形態検査の好中球数、リンパ球数、好塩基球数、単球数及び非染色性大型細胞数の高値がみられ、MCV及びMCHの低値、PT及びAPTTの延長が認められた。また、20及び100 mg/kg群の雌でヘモグロビン量の低値がみられ、100 mg/kg群の雌でヘマトクリットの低値が認められた。

### 6. 血液生化学的検査

13週間投与終了時の検査では、100 mg/kg群の雄で $\beta$ -グロブリン比の高値及びクロールの低値がみられ、同群の雌でA/G比及びアルブミンの低値、 $\beta$ -グロブリン比及び総コレステロール

の高値が認められた。さらに、20 mg/kg 群の雌で総コレステロールの高値が認められた。

52週間投与終了時の検査では、100 mg/kg 群の雄でA/G比及びアルブミン比の低値がみられ、 $\alpha_2$ -グロブリン比、 $\beta$ -グロブリン比及びALTの高値が認められた。また、同群の雌でA/G比、アルブミン比及びナトリウムの低値がみられ、総蛋白質、 $\alpha_1$ -グロブリン比、 $\beta$ -グロブリン比、総コレステロール及びリン脂質の高値が認められた。

## 7. 剖検

13週間投与終了時の検査では、全例で被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

52週間投与終了時の検査では、20 mg/kg 群の雄1例、100 mg/kg 群の雄4例及び雌3例で肝臓の肥大、100 mg/kg 群の雄1例で脾臓の肥大が認められた。

## 8. 器官重量

13週間投与終了時の検査では、20 mg/kg 群の雌で肝臓の相対重量の高値、100 mg/kg 群の雌雄で肝臓の絶対及び相対重量の高値が認められた。また、100 mg/kg 群の雌では腎臓の相対重量の高値が認められた。

52週間投与終了時の検査では、4 mg/kg 群の雌で肝臓の相対重量、20 mg/kg 群の雌並びに100 mg/kg 群の雌雄で肝臓の絶対及び相対重量の高値が認められた。また、100 mg/kg 群の雄で甲状腺の絶対及び相対重量の高値がみられ、100 mg/kg 群の雌で腎臓の絶対重量の高値が認められた。

## 9. 病理組織学的検査

13週間投与終了時の検査では、被験物質投与に起因した変化が肝臓及び腸間膜リンパ節に認められた。肝臓では、20 mg/kg 群の雌2例、100 mg/kg 群の雄2例及び雌9例で小葉中心性の軽度ないし中等度の肝細胞肥大が認められ、肥大した肝細胞は弱好酸性の均一な細胞質を有していた。腸間膜リンパ節では、100 mg/kg 群の雄2例及び雌1例で軽度の泡沫細胞集積が認められた。

52週間投与終了時の検査では、被験物質投与に起因した変化が、肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節に加えて、脾臓、十二指腸、空腸及び回腸でも認められた。肝臓では、20 mg/kg 群の雌4例、100 mg/kg 群の雄2例及び雌全例で小葉中心性の軽度ないし中等度の肝細胞肥大が引き続き

認められた。これらに加えて、対照群の雄 6 例及び雌 3 例、4 mg/kg 群の雌雄各 1 例、20 mg/kg 群の雄 4 例及び雌 2 例、100 mg/kg 群の雄 5 例及び雌 7 例で小葉辺縁部の肝細胞の軽度ないし中等度の脂肪変性がみられ、対照群と比べて 100 mg/kg 群の雌で有意に増強した。また、対照群の雌雄各 1 例、20 mg/kg 群の雌雄各 2 例、100 mg/kg 群の雄 7 例及び雌 1 例で軽度ないし中等度の胆管の過形成がみられ、対照群と比べて 100 mg/kg 群の雄で有意に増強した。さらに、20 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例並びに 100 mg/kg 群の雄全例及び雌 9 例で類洞の軽度ないし中等度の泡沫細胞集積がみられ、その周囲にはリンパ球浸潤が認められた。腎臓では、対照群の雄 5 例、4 及び 20 mg/kg 群の雄各 5 例及び雌各 3 例、100 mg/kg 群の雄 9 例及び雌 5 例で軽度ないし中等度の好塩基性尿細管がみられ、対照群と比べて 100 mg/kg 群の雌で有意に増強した。腸間膜リンパ節では、20 mg/kg 群の雄 5 例及び雌 3 例、並びに 100 mg/kg 群の雌雄全例で軽度ないし重度の泡沫細胞集積が引き続き認められた。脾臓では、20 mg/kg 群の雄 1 例及び 100 mg/kg 群の雌雄各 4 例で脾臓の赤脾髄及び白脾髄の軽度ないし中等度の泡沫細胞集積が認められた。十二指腸では、100 mg/kg 群の雌雄各 1 例、空腸では 100 mg/kg 群の雄 8 例及び雌 6 例で粘膜固有層の軽度の泡沫細胞集積が認められた。回腸では、100 mg/kg 群の雄 6 例及び雌 1 例で粘膜固有層の軽度の泡沫細胞集積、100 mg/kg 群の雄 3 例及び雌 1 例でパイエル板の軽度の泡沫細胞集積が認められた。

以上のことから、本試験条件下における 1,1-ビス[tert-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの無影響量 (NOEL) は雄では 4 mg/kg/day, 雌では 4 mg/kg/day 未満と判断した。

# 1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの 細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of 1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane on Bacteria

### 要約

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験の結果、5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  までの用量で直接法および代謝活性化法ともに全ての菌株において生育阻害が認められなかったため、313~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の範囲(公比2)で設定した。

試験を2回行った結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められず、また、菌の生育阻害も認められなかった。

以上の成績から、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

### 方法

#### 1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1</sup> および *E. coli* WP2 *uvrA*<sup>2</sup> の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その25  $\mu\text{L}$  をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液は濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり $1 \times 10^8$ 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、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。

#### 2. 被験物質

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン(ロット番号8X01, 日本油脂(株)(東京)提供)は、無色ないし淡黄色透明の液体で、水およびジメチル

スルホキシド(DMSO)に不溶、アセトンに易溶であり、純度97.9%(不純物として、原料である3,3,5-トリメチルシクロヘキサン約1.89%を含む)の物質である。被験物質は、冷暗所(4℃)で密栓保管した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 3. 被験物質供試液の調製

溶媒にアセトン(和光純薬工業(株))を用い、被験物質を溶解して最高用量の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

#### 4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9-AA : 9-アミノアクリジン(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO(和光純薬工業(株))に、NaN<sub>3</sub> および 9-AA は蒸留水(味大塚製薬工場)に溶解した。

#### 5. 培地

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

##### 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 Laboratories) および 0.5 w/v% 塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ピオチン および 0.5 mM L-ヒスチジン水溶液、*E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え、トップアガーとした。



6. S9 mix

エームテスト用凍結S9 mix(キッコーマン株)を購入し、製造後6ヶ月以内に使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを授与した prague-Dawley 系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

7. 試験方法

試験は、プレインキュベーション法で行った。

試験管に使用溶媒0.05 mL, 被験物質供試液0.05 mL あるいは陽性対照物質溶液0.1 mLを入れ、次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL, 代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え、続いて試験菌液0.1 mLを分注し、37°Cで20分間振盪培養した。培養終了後、45°Cに保温したトッパアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは、用量設定試験では各用量とも1枚、本試験では3枚を使用した。本試験は、同一用量を用いて2回行った。

8. 結果の判定

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が溶媒対照値の2倍以上を示し、用量依存性および結果の再現性が認められる場合を陽性とした。

但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定することとした。

結果および考察

20~5000 µg/plateの範囲で行った用量設定試験においては、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。したがって、本試験における被験物質の用量は、最高用量を5000 µg/plateとし、以下公比2で、2500, 1250, 625および313 µg/plateとした。

試験を2回行った結果(Tables 1~4)、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試した全ての菌株において復帰変異コロニー数は、溶媒対照値の2倍を越えることはなく、また、菌の生育阻害も認められなかった。

なお、代謝活性化の有無にかかわらず、1250 µg/plate以上の用量で培養終了時、プレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、1,1-ビス(tert-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

なお、1,1-ビス(tert-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンおよびその類縁化合物の変異原性に関する報告は見当たらない。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol.3, eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.

連絡先

試験責任者: 野田 篤  
 試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美  
 (財)畜産生物科学安全研究所  
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11  
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)  
 Naomi Kon  
 Research Institute for Animal Science in  
 Biochemistry and Toxicology  
 3-7-11 Hashimoto-dai, Sagami-hara-shi, Kanagawa,  
 229-1132 Japan  
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

Table 1 Results of reverse mutation test of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane on bacteria (1st trial) [direct method:-S9 mix]

Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	127	129	119	15	14	13	18	17	23	29	21	18	10	9	8
	[125 $\pm$ 5]			[14 $\pm$ 1]			[19 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 6]			[9 $\pm$ 1]		
313	120	108	126	17	11	12	14	24	18	26	21	19	11	8	9
	[118 $\pm$ 9]			[13 $\pm$ 3]			[19 $\pm$ 5]			[22 $\pm$ 4]			[9 $\pm$ 2]		
625	136	130	137	13	14	15	16	19	27	18	24	21	12	15	15
	[134 $\pm$ 4]			[14 $\pm$ 1]			[21 $\pm$ 6]			[21 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 2]		
1250 <sup>a</sup>	122	118	120	10	9	5	23	17	17	26	19	40	8	11	8
	[120 $\pm$ 2]			[8 $\pm$ 3]			[19 $\pm$ 3]			[28 $\pm$ 11]			[9 $\pm$ 2]		
2500 <sup>a</sup>	130	138	132	13	9	11	21	18	17	21	29	30	11	9	15
	[133 $\pm$ 4]			[11 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 5]			[12 $\pm$ 3]		
5000 <sup>a</sup>	128	118	134	6	7	7	17	16	16	30	26	25	14	17	9
	[127 $\pm$ 8]			[7 $\pm$ 1]			[16 $\pm$ 1]			[27 $\pm$ 3]			[13 $\pm$ 4]		
Positive control	847	782	760 <sup>a</sup>	390	432	400 <sup>a</sup>	714	697	746 <sup>a</sup>	462	486	446 <sup>a</sup>	546	520	703 <sup>a</sup>
	[796 $\pm$ 45]			[407 $\pm$ 22]			[719 $\pm$ 25]			[465 $\pm$ 20]			[590 $\pm$ 99]		

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

a) AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) NaN<sub>3</sub>: Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) AF-2, 0.04  $\mu\text{g}/\text{plate}$

d) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$

e) 9-AA: 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2 Results of reverse mutation test of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane on bacteria (1st trial) [activation method:+S9 mix]

Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	118	127	114	11	15	14	24	20	17	37	35	27	11	10	15
	[120 $\pm$ 7]			[13 $\pm$ 2]			[20 $\pm$ 4]			[33 $\pm$ 5]			[12 $\pm$ 3]		
313	117	131	130	13	13	14	20	27	18	46	46	40	18	11	12
	[126 $\pm$ 8]			[13 $\pm$ 1]			[22 $\pm$ 5]			[44 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 4]		
625	117	105	132	13	14	17	21	21	22	35	18	34	13	16	12
	[118 $\pm$ 14]			[15 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 1]			[29 $\pm$ 10]			[14 $\pm$ 4]		
1250 <sup>a</sup>	122	121	121	16	11	12	21	17	26	31	32	31	7	12	15
	[121 $\pm$ 1]			[13 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 5]			[31 $\pm$ 1]			[11 $\pm$ 4]		
2500 <sup>a</sup>	123	122	105	7	7	8	23	22	30	32	29	27	14	14	7
	[117 $\pm$ 10]			[7 $\pm$ 1]			[25 $\pm$ 4]			[29 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 4]		
5000 <sup>a</sup>	134	139	106	6	6	10	30	22	28	38	25	20	15	10	9
	[126 $\pm$ 18]			[7 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 4]			[28 $\pm$ 9]			[11 $\pm$ 3]		
Positive control	689	718	671 <sup>a</sup>	150	159	136 <sup>a</sup>	820	829	864 <sup>a</sup>	411	357	402 <sup>a</sup>	111	114	125 <sup>a</sup>
	[693 $\pm$ 24]			[155 $\pm$ 5]			[838 $\pm$ 23]			[390 $\pm$ 29]			[117 $\pm$ 7]		

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

a) AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$

復帰変異試験

Table 3 Results of reverse mutation test of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane on bacteria (2nd trial) [direct method: -S9 mix]

Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	98	100	122	12	10	14	15	18	21	30	28	27	8	8	10
	[107 $\pm$ 13]			[12 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 3]			[28 $\pm$ 2]			[9 $\pm$ 1]		
313	105	112	131	9	12	8	20	18	15	25	32	33	14	12	12
	[116 $\pm$ 13]			[10 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 3]			[30 $\pm$ 4]			[13 $\pm$ 1]		
625	110	90	108	9	13	10	22	17	16	30	31	31	14	11	13
	[103 $\pm$ 11]			[11 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 3]			[31 $\pm$ 1]			[13 $\pm$ 2]		
1250 <sup>a</sup>	107	108	129	8	5	5	12	14	16	14	27	22	6	11	7
	[115 $\pm$ 12]			[6 $\pm$ 2]			[14 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 7]			[8 $\pm$ 3]		
2500 <sup>b</sup>	121	83	109	6	6	9	16	25	14	17	21	24	12	10	8
	[104 $\pm$ 19]			[7 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 6]			[21 $\pm$ 4]			[10 $\pm$ 2]		
5000 <sup>c</sup>	119	91	112	9	9	14	15	15	14	32	26	32	7	14	10
	[108 $\pm$ 13]			[11 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 1]			[30 $\pm$ 3]			[10 $\pm$ 4]		
Positive control	795	783	829 <sup>d</sup>	386	358	336 <sup>e</sup>	716	806	691 <sup>f</sup>	472	488	402 <sup>g</sup>	428	512	557 <sup>h</sup>
	[802 $\pm$ 24]			[360 $\pm$ 25]			[738 $\pm$ 60]			[454 $\pm$ 46]			[499 $\pm$ 65]		

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

a) AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) NaN<sub>3</sub>: Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) AF-2, 0.04  $\mu\text{g}/\text{plate}$

d) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$

e) 9-AA: 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4 Results of reverse mutation test of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane on bacteria (2nd trial) [activation method: +S9 mix]

Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	116	105	102	9	7	10	25	22	21	41	25	35	16	11	10
	[108 $\pm$ 7]			[9 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 2]			[31 $\pm$ 8]			[12 $\pm$ 3]		
313	127	105	120	7	13	8	21	30	10	27	33	44	16	13	19
	[117 $\pm$ 11]			[9 $\pm$ 3]			[20 $\pm$ 10]			[35 $\pm$ 9]			[16 $\pm$ 3]		
625	118	118	115	10	8	12	31	24	21	31	32	29	10	15	13
	[117 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 2]			[25 $\pm$ 5]			[31 $\pm$ 2]			[13 $\pm$ 3]		
1250 <sup>a</sup>	128	128	104	13	11	7	12	28	26	40	28	36	13	15	14
	[120 $\pm$ 14]			[10 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 9]			[35 $\pm$ 6]			[14 $\pm$ 1]		
2500 <sup>b</sup>	120	100	118	9	15	6	24	19	25	23	30	45	14	18	15
	[113 $\pm$ 11]			[10 $\pm$ 5]			[23 $\pm$ 3]			[33 $\pm$ 11]			[16 $\pm$ 2]		
5000 <sup>c</sup>	93	131	101	13	11	6	20	24	17	33	23	23	6	13	10
	[108 $\pm$ 20]			[10 $\pm$ 4]			[20 $\pm$ 4]			[26 $\pm$ 6]			[10 $\pm$ 4]		
Positive control	699	668	623 <sup>d</sup>	214	193	184 <sup>e</sup>	685	723	803 <sup>f</sup>	339	382	362 <sup>g</sup>	173	121	142 <sup>h</sup>
	[663 $\pm$ 38]			[197 $\pm$ 15]			[737 $\pm$ 60]			[361 $\pm$ 22]			[145 $\pm$ 26]		

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

a) 2-AA: 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$

# 1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの 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 1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane on Cultured Chinese Hamster Cells

#### 要約

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を用いて *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、細胞増殖抑制試験を行った結果、短時間処理法 S9 mix 非存在下では 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のみ 50 % をやや上回る細胞増殖抑制が認められたが、その他の用量では 50 % を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。S9 mix 存在下では 50 % を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。連続処理法 24 時間処理では 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上で 50 % を上回る細胞増殖抑制が認められた。したがって、染色体異常試験における用量は、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では 93.75, 187.5, 375, 750, 1500 および 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix 存在下では 375, 750, 1500 および 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。また、連続処理法 24 時間処理では 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50 および 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。

試験の結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下並びに連続処理法 24 時間処理のいずれの場合においても、染色体異常を有する細胞の増加は認められなかった。

以上の成績から、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

#### 方法

##### 1. 試験細胞株

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部(元:国立衛生試験所変異原性部)から昭和60年1月13日に分与を受けたチャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に 10 vol% の割合でジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業株)を添加し、液体窒素条件下で保存したものを培養液に戻し、解凍後の継代数が7回までのものを使用した。

##### 2. 培養液

Eagle-MEM 粉末培地(Gibco Laboratories)を常法に従い調製し、これに非働化仔牛血清(Gibco Laboratories)を 10 vol% の割合で添加したものをを用いた。

##### 3. 培養条件

$4 \times 10^3$  個/mL の細胞を含む培養液 5 mL をディッシュ(径 6 cm, Becton Dickinson Co.)に加え、37 °C の CO<sub>2</sub> インキュベーター(5 % CO<sub>2</sub>)内で培養した。

短時間処理法では、培養開始3日後に被験物質を加え S9 mix 非存在および存在下で6時間処理し、処理終了後、新鮮培養液でさらに18時間培養した。連続処理法では、培養開始3日後に被験物質を加え24時間処理した。

##### 4. S9 mix

染色体異常試験用凍結 S9 mix(キッコマン株)を購入し、製造後6ヶ月以内に使用した。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。

##### 5. 被験物質

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのロット番号 8X01, 日本油脂株(東京)提供)は、無色ないし淡黄色透明の液体で、水および DMSO に不溶、アセトンに易溶であり、純度 97.9 % (不純物として、原料である 3,3,5-トリメチルシクロヘキサン約 1.89 % を含む)の物質である。被験物質は、冷暗所(4 °C)で密栓保管した。

実験終了後、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. 被験物質供試液の調製

溶媒にアセトン(和光純薬工業株)を用い、被験物質を溶解して最高用量の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、そのディッシュ内への添加量は培養液量の 0.5 vol% とした。

##### 7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の用量を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。0.1 w/v% クリスタルバイオレット水溶液で染色した細胞の密度を単層培養細胞密度計(モノセレーター II, MI-60, オリンパス光学工業株)を用いて測定し、溶媒対照群の細胞増殖率を 100 % とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果(Fig. 1, 2), 短時間処理法においては、S9 mix 非存在下では 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 50 % をやや上回る細胞増

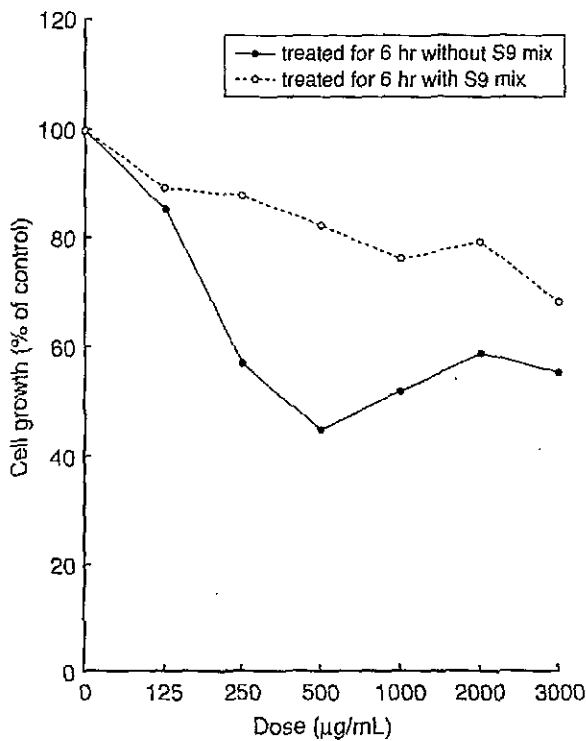


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,1-bis(*tert*-butylidioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane

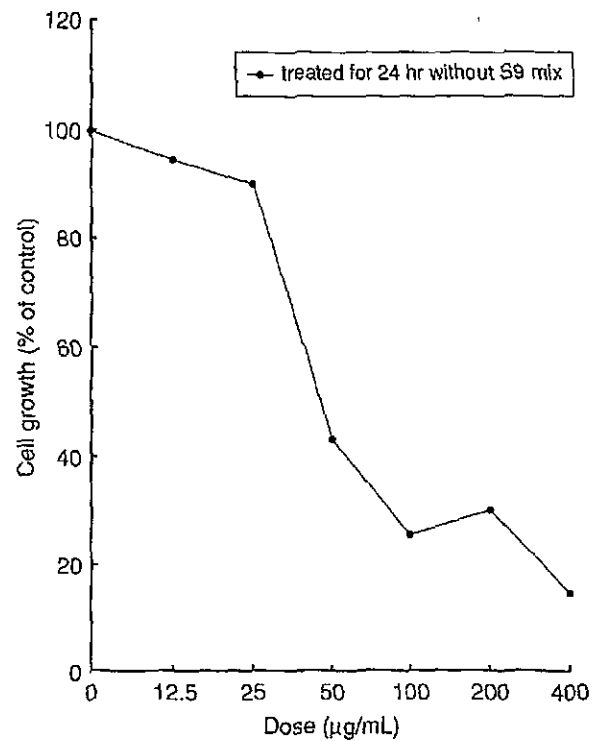


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,1-bis(*tert*-butylidioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane

殖抑制が認められたものの、他の用量においては50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。また、S9 mix存在下ではいずれの用量においても50%を上回る細胞増殖抑制は認められず、50%細胞増殖抑制用量は3000 µg/mL以上と判断された。連続処理法24時間処理では50 µg/mL以上で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は25~50 µg/mLの用量域にあるものと判断された。

#### 8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果から、染色体異常試験における被験物質の用量は、短時間処理法の場合は、10 mMに相当する3000 µg/mLを最高用量とし、S9 mix非存在下では93.75, 187.5, 375, 750, 1500および3000 µg/mLの6用量(公比2)、S9 mix存在下では375, 750, 1500および3000 µg/mLの4用量(公比2)とした。連続処理法24時間処理の場合は、50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ3用量以上のデータが得られることを考慮して、6.25, 12.5, 25, 37.5, 50および100 µg/mLとした。対照として、溶媒対照群と陽性対照群を設けた。

陽性対照として、短時間処理法S9 mix存在下では3,4-benzo[*a*]pyrene(B[*a*]P, Sigma Chemical Co.)を10 µg/mL、短時間処理法S9 mix非存在下および連続処理法では1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine(MNNG, Aldrich Chemical Co.)を2.5 µg/mLの用量で用いた。陽性対照物質の溶媒には、いずれもDMSO(和光純薬工業(株))を使用した。

#### 9. 染色体標本の作製

培養終了2時間前にコルセミド(Gibco Laboratories)を最終濃度として0.2 µg/mLとなるように添加した。トリプシン処理で細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.4 vol%ギムザ液で約15分間染色した。

#### 10. 染色体の観察

各ディッシュあたり100個、すなわち、1用量当たり2ディッシュ、200個の分裂中期像を、総合倍率600倍の顕微鏡下で観察した。標本は全てコード化し、盲検法で観察を行った。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(MMS)による分類法<sup>1)</sup>に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型の切断、交換などの構造異常と倍数性細胞(Polyploid)の有無について観察した。

#### 11. 記録と判定

観察した細胞数、構造異常の種類と数および倍数性細胞の数について集計し、記録した。

染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度について、多試料 $\chi^2$ 検定を行い有意差(有意水準5%以下)が認められた場合は、フィッシャーの直接確率法を用いて溶媒対照群と各用量群との間の有意差検定(有意水準は、多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた)を行った。

その結果、溶媒対照群と比較して、被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が2用量以上で有意に増加し、かつ用量依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

#### 結果および考察

短時間処理法による結果をTable 1に示す。1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンを加えてS9 mix非存在および存在下で6時間処理したいずれの用量群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

連続処理法による結果をTable 2に示す。被験物質を加えて24時間処理したいずれの用量においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

したがって、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。本試験結果は、CHL/IU細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性とする石館らの判定基準<sup>2)</sup>からみても、明らかに陰性と判断されるものであった。

なお、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンおよびその類縁化合物の変異原性に関する報告は見当たらない。

#### 文献

- 1) 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.16-37.
- 2) 石館基監修，“改定増補染色体異常試験データ集，”エル・アイ・シー，東京，1987，p.19.

#### 連絡先

試験責任者：野田 篤  
試験担当者：野田 篤，昆 尚美  
財団法人畜産生物科学安全研究所  
〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11  
Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

#### Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)  
Naomi Kon  
Research Institute for Animal Science in  
Biochemistry and Toxicology  
3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, kanagawa,  
229-1132 Japan  
Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

染色体異常試験

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane with and without S9 mix

Group	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of cells with structural aberrations						gap (%)	No. of cells with numerical aberrations		Cell Growth rate (%)
					ctb	cte	csb	cse	oth	total (%) <sup>2</sup>		Polyploid	total (%) <sup>2</sup>	
Solvent <sup>1</sup>	0	-	6-(18)	200	1	0	0	2	0	3(1.5)	0(0)	0	0(0)	100.0
BTBTC	93.75	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	1(0.5)	0(0)	0	0(0)	70.5
	187.5	-	6-(18)	200	2	0	0	0	0	2(1.0)	0(0)	0	0(0)	50.0
	375	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0(0)	1(0.5)	0	0(0)	50.5
	750	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	1(0.5)	1(0.5)	0	0(0)	41.5
	1500	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	1(0.5)	0(0)	1	1(0.5)	41.0
	3000	-	6-(18)	200	0	1	0	2	0	2(1.0)	0(0)	1	1(0.5)	46.5
MNNG	2.5	-	6-(18)	200	64	194	1	0	0	196(98.0)**	4(2.0)	0	0(0)	-
Solvent <sup>2</sup>	0	+	6-(18)	200	0	1	0	1	0	2(1.0)	0(0)	0	0(0)	100.0
BTBTC	375	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	1(0.5)	0(0)	0	0(0)	97.5
	750	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	1	1(0.5)	102.0
	1500	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0	0(0)	98.5
	3000	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0(0)	2(1.0)	0	0(0)	99.0
BP	10	+	6-(18)	200	12	90	0	0	0	93(46.5)**	1(0.5)	0	0(0)	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, BTBTC: 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane, MNNG: 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine, BP: 3,4-benzo[a]pyrene 1) Acetone was used as solvent. 2) Multi-sample  $\chi^2$  test was done at  $p < 0.05$  and then Fisher's exact test was done at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ . \*\*; Significantly different from solvent group data at  $p < 0.01$  by Fisher's exact test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane without S9 mix

Group	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of cells with structural aberrations						gap (%)	No. of cells with numerical aberrations		Cell Growth rate (%)
				ctb	cte	csb	cse	oth	total (%) <sup>2</sup>		Polyploid	total (%) <sup>2</sup>	
Solvent <sup>1</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0(0)	2(1.0)	2	2(1.0)	100.0
BTBTC	6.25	24	200	0	0	0	0	0	0(0)	1(0.5)	0	0(0)	91.5
	12.5	24	200	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	2	2(1.0)	86.5
	25	24	200	1	1	0	0	0	1(0.5)	1(0.5)	0	0(0)	85.0
	37.5	24	200	0	2	0	0	0	2(1.0)	1(0.5)	1	1(0.5)	70.5
	50	24	200	0	1	0	1	0	2(1.0)	0(0)	0	0(0)	52.5
	100	24	200	0	1	0	0	0	1(0.5)	0(0)	1	1(0.5)	34.0
MNNG	2.5	24	200	60	194	3	0	0	195(97.5)**	0(0)	0	0(0)	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, BTBTC: 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane, MNNG: 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine, BP: 3,4-benzo[a]pyrene 1) Acetone was used as solvent. 2) Multi-sample  $\chi^2$  test was done at  $p < 0.05$  and then Fisher's exact test was done at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ . \*\*; Significantly different from solvent group data at  $p < 0.01$  by Fisher's exact test.

## Research Section

### CARCINOGENICITY STUDY OF 1,1-BIS(*tert*- BUTYLPEROXY)-3,3,5-TRIMETHYLCYCLOHEXANE IN B6C3F<sub>1</sub> MICE

M. MITSUI, F. FURUKAWA, M. SATO, T. ENAMI, T. IMAZAWA, A. NISHIKAWA and M. TAKAHASHI\*

Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,  
Tokyo 158, Japan

(Accepted 14 July 1993)

**Abstract**—1,1-Bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) is widely used in the manufacture of rubber. The present carcinogenicity study in B6C3F<sub>1</sub> mice was carried out in order to assess its potential to induce tumours. BBTC was administered at dietary levels of 0 (control), 0.25 and 0.5% for 78 wk; these dose levels were selected on the basis of a subchronic toxicity study, in which body weights were depressed to less than 90% of the control group values and swelling of hepatocytes was histologically evident in animals fed 1% BBTC or more in the diet. Neoplasms were found in all groups, including the control group, but there were no significant differences between groups of either sex in mortality, tumour incidences or tumour distribution. All tumours were considered to be spontaneous because of the similarity to background data for B6C3F<sub>1</sub> mice. This study thus provides no evidence of carcinogenicity of BBTC in B6C3F<sub>1</sub> mice.

#### INTRODUCTION

1,1-Bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) is widely used as a source of free radicals in the hardening of unsaturated polyester resins and the polymerization of styrene, finding particular application in the rubber industry. Its chemical structure is illustrated in Fig. 1. BBTC is not mutagenic in *Salmonella typhimurium* (E. Machigaki, personal communication, 1987). Although lauroyl peroxide (another source of free radicals used as an initiator in the polymerization of vinyl chloride in rubber manufacture) has also been shown not to be mutagenic in *S. typhimurium* (Yamaguchi and Yamashita, 1980), this compound has been suspected from bioassay data to have carcinogenic potential (Kotin and Falk, 1963). In addition, other free radical sources in the plastics and rubber industries such as *tert*-butylperoxy benzoate (Kotin and Falk, 1963) and benzoyl peroxide (Slaga *et al.*, 1981) have been shown to exert skin tumour-promoting activities or to be suspected carcinogens in preliminary animal studies.

Because BBTC has not been sufficiently examined for its possible toxicity and carcinogenicity despite its wide industrial use, the present investigation was carried out to assess any carcinogenic potential of the compound. This study was performed as a part of the risk re-evaluation of existing chemicals in Japan.

#### MATERIALS AND METHODS

##### *Animals*

Male and female B6C3F<sub>1</sub> mice, purchased at the age of 5 wk from Charles River Japan Inc. (Kanagawa, Japan), were maintained on basal diet (MF; Oriental Yeast Ind. Co., Tokyo, Japan) and tap water until they were 6 wk old, when the studies started.

##### *Chemical*

BBTC (CAS No. 6731-86-8), purchased from Nippon Yushi Co. (Tokyo, Japan), was in a liquid form and was over 90% pure. It was administered orally to animals in the diet as detailed below. The diet supplemented with BBTC was kept at 4°C.

##### *Housing conditions*

Mice were housed 10 to a plastic cage, with soft-wood chips as bedding. The room was maintained at a temperature of 23 ± 2°C and a humidity of 55 ± 5%, with a 12-hr light/dark cycle.

##### *Experimental design*

A preliminary subchronic toxicity study was carried out prior to the carcinogenicity study.

*Subchronic toxicity study.* BBTC was added to MF powdered basal diet and fed *ad lib.* to groups of 10 male and 10 female mice at dietary concentrations of 0.5, 1.0, 2.0 or 4.0% for 13 wk. Control animals received the basal diet without BBTC. Throughout the experiment, mice were given tap water *ad lib.* 20 animals were observed daily for clinical signs and

\*To whom correspondence should be addressed.

Abbreviation: BBTC = 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane.



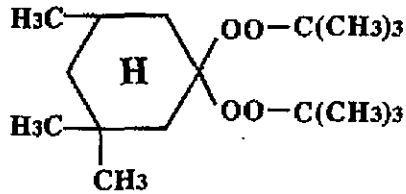


Fig. 1. Chemical structure of 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC).

deaths were recorded. At the end of the experiment, all surviving mice were killed, and major organs/tissues were taken for gross and microscopic examination. The results were used to determine appropriate dose levels for the subsequent carcinogenicity study.

**Carcinogenicity study.** Mice were divided randomly into three groups, each consisting of 50 males and 50 females. BBTC was added to the powdered basal diet at 0 (control), 0.25 or 0.5%. These dose levels were selected according to the results of the subchronic toxicity study. Animals were given their respective diet *ad lib.* for 78 wk, and the amounts of food consumed were measured in order to calculate the actual intakes of BBTC. Throughout the experiment, mice had free access to tap water. All mice were observed daily for clinical signs and deaths were recorded. Body weights were measured once a week for the first 13 wk of the study and then once every 4 wk. After 78 wk, the administration of BBTC was stopped and mice were then maintained on the powdered basal diet until wk 83 when all surviving animals were killed. All mice found dead, killed when moribund or killed at the end of the study were completely autopsied, and their organs were fixed

routinely in 10% buffered formalin, sectioned and stained with haematoxylin and eosin.

**Statistical analysis.** Data were analysed for statistical significance by Fisher's exact probability test and the chi-square test.

## RESULTS

### Subchronic toxicity study

Two males and two females given 4.0% BBTC died during the study, all other mice survived until wk 13. Throughout the experiment, body weight gain and food consumption in the BBTC-treated groups were lower than those of the controls. For both sexes, the only dose of BBTC at which final body weights were in excess of 90% of the control values was 0.5%. Haematological examinations showed a tendency of anaemia in groups of both sexes receiving 1.0% BBTC or more. Relative liver weights were significantly increased in BBTC-treated mice in a dose-dependent manner. In contrast, absolute and relative spleen weights were decreased in a dose-dependent manner. Histopathological examinations revealed swelling of hepatocytes in male and female mice fed 1.0% BBTC or more, and atrophy of the red and white pulp in the spleen as well as a decrease of haematopoietic cells in the bone marrow were observed in males given 2.0 or 4.0% BBTC and in females fed 4.0% BBTC. From these results it was concluded that, with particular consideration given to growth retardation and histopathological findings, the maximum long-term dose of dietary BBTC that can be tolerated would be 0.5% for mice of both sexes. Therefore, 0.25 and 0.5% were selected as

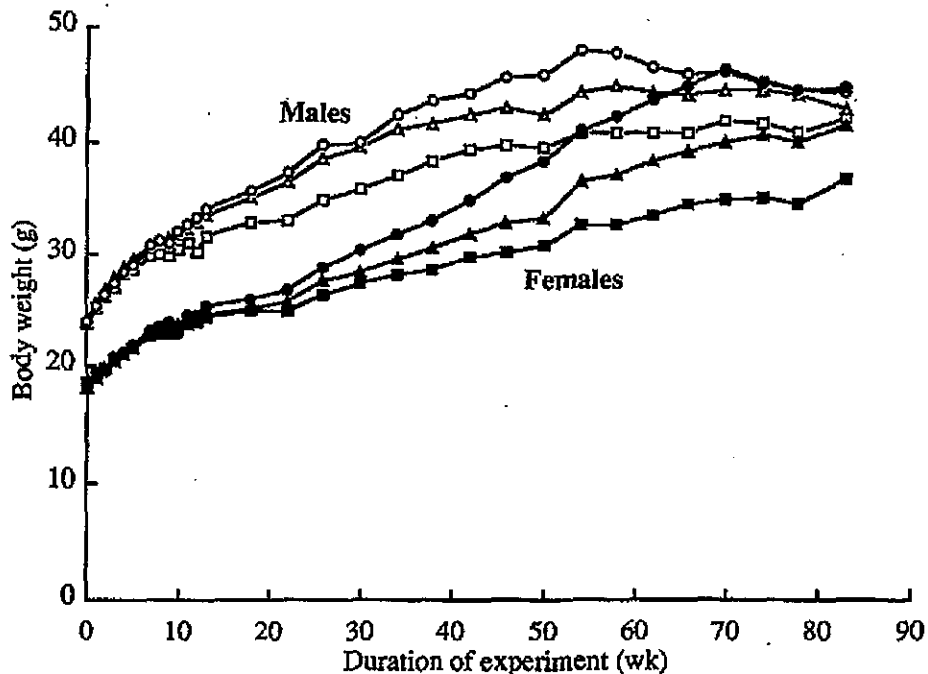


Fig. 2. Growth curves of B6C3F<sub>1</sub> mice given 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in the diet for 78 wk at 0 (males, ○; females, ●), 0.25 (males, △; females, ▲) or 0.5% (males, □; females, ■). Surviving mice were observed for a further 10 wk and killed at 83 wk.

Table 1. Total tumour incidences, food consumption, 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) intake, final survival rate and mean survival time of B6C3F<sub>1</sub> mice given BBTC in the diet for 78 wk

BBTC dose (%)	No. of mice			Food consumption (g/animal/day)	Mean total BBTC intake (g/kg body weight/78 wk)	Final survival rate (%)	Mean survival time and range (wk)
	Initial	Effective	With tumour				
<b>Males</b>							
0	50	49	29	5.6	0	98.0	83.0 (82-83)
0.25	50	48	30	5.1	187	95.8	80.8 (23-83)
0.5	50	50	30	4.7	373	94.0	82.4 (61-83)
<b>Females</b>							
0	50	50	19	6.3	0	94.0	80.6 (15-83)
0.25	50	49	18	6.1	280	94.8	81.9 (47-83)
0.5	50	50	21	5.9	576	96.0	82.7 (73-83)

appropriate dose levels for the subsequent carcinogenicity study.

#### Carcinogenicity study

**Growth and mortality.** The growth curves (Fig. 2) showed a dose-dependent inhibitory effect of BBTC on the growth of mice of both sexes in the 0.25 and 0.5% groups. The survival rates and mean survival times (Table 1), however, indicated no significant differences between groups of either sex.

**Tumour incidence and BBTC intake.** Overall tumour incidences and total intakes of BBTC are

summarized in Table 1. There were no significant differences in total tumour incidences between groups of either sex. Total intakes of BBTC, estimated from the food consumption data, were dose related.

**Distribution and histopathology.** The sites, histological types and incidences of tumours in each group are summarized in Table 2. Tumours were found in various organs from mice of both sexes in each group, including the control group. However, all the tumours were considered to be spontaneous because their incidences were essentially similar to those of spontaneous neoplastic lesions reported previously in

Table 2. Sites and types of tumours in B6C3F<sub>1</sub> mice given 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) in the diet for 78 wk

Site and type of tumour	No. of mice with tumours					
	Males			Females		
	0	0.25	0.5	0	0.25	0.5
Effective no. of mice	48	47	50	47	47	50
<b>Lung</b>						
Alveolar/bronchiolar adenoma	1	2	1	1	1	1
Alveolar/bronchiolar carcinoma	5	4	0*	0	1	0
<b>Spleen</b>						
Haemangioma	1	0	0	0	0	0
Haemangiosarcoma	1	0	0	1	0	0
<b>Haematopoietic system</b>						
Lymphoma	6	5	8	13	12	11
Histiocytic sarcoma	1	0	0	0	2	2
<b>Small intestine</b>						
Adenoma	0	1	0	0	0	0
Adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0
<b>Liver</b>						
Hepatocellular adenoma	15	20	20	0	0	0
Hepatocellular carcinoma	8	7	7	0	0	0
Haemangioma	0	1	0	0	0	0
Haemangiosarcoma	1	1	0	0	0	0
<b>Pancreas</b>						
Acinar cell adenoma	0	0	0	0	0	1
Islet cell adenoma	1	1	0	0	0	0
<b>Kidney</b>						
Renal cell carcinoma	1	0	0	0	0	0
<b>Adrenal gland</b>						
Pheochromocytoma	0	0	2	0	0	1
Cortical adenoma	0	0	0	0	1	1
<b>Thyroid gland</b>						
Follicular cell adenoma	0	0	0	1	0	0
<b>Pituitary gland</b>						
Adenoma (pars distalis)	0	0	0	1	0	0
<b>Uterus</b>						
Endometrial stromal polyp	—	—	—	1	0	0
Endometrial stromal sarcoma	—	—	—	1	1	2
<b>Harderian gland</b>						
Adenoma	5	3	0*	2	2	4
Adenocarcinoma	1	0	1	0	0	1
<b>Skin/subcutis</b>						
Schwannoma, malignant	0	1	0	0	0	0
Mastocytoma	0	0	0	0	0	1

\*Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ).

Table 3. Incidences of total tumours and malignant tumours in B6C3F<sub>1</sub> mice given 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) in the diet for 78 wk

Parameter	BBTC dose (%)	Males			Females		
		0	0.25	0.5	0	0.25	0.5
Effective no. of mice		49	48	50	50	49	50
No. of mice with tumours		29	30	30	19	18	21
Tumours/animal		0.94	0.94	0.78	0.42	0.41	0.48
No. of mice with malignant tumours		22	16	15	14	15	15
Malignant tumours/animal		0.49	0.39	0.32	0.30	0.33	0.30

B6C3F<sub>1</sub> mice (Tamano *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1979). BBTC treatment did not increase the incidences of any benign or malignant tumours (Table 3). Although the incidences of lymphomas and those of lung and Harderian gland tumours in both sexes, and liver tumours in males were relatively high in the control group compared with background data, there were no significant differences. Interestingly, the incidences of lung carcinomas and Harderian gland adenomas in male mice were decreased in a dose-dependent manner with statistical significance in the high-dose group.

*Non-neoplastic lesions.* Although non-neoplastic lesions were observed frequently in all groups, including the controls, no significant differences were found between groups. Swelling of centrilobular hepatocytes, as observed in the subchronic toxicity study, was evident only in male mice fed 0.5% BBTC.

#### DISCUSSION

Tumours of the liver, haematopoietic organs, lung and Harderian gland are known to develop spontaneously in mice of the B6C3F<sub>1</sub> strain (Tamano *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1979). In the present study, BBTC administration neither increased the incidences of such spontaneous tumours nor induced any unusual neoplasms. Slight but significant decreases in the incidences of lung carcinomas and Harderian gland adenomas were associated with BBTC treatment. With regard to lung carcinomas, similar results have previously been reported for cyclohexane (Lijinsky and Kovatch, 1986). The present results therefore suggest that BBTC may inhibit directly the development of some spontaneous tumours; however, the dose-dependent decreases in food consumption and body weight gain in the BBTC-treated groups may have acted as factors that suppress tumour development. Based on the fact that the incidences of both lung and Harderian gland tumours in the control group were elevated compared with earlier background data (Tamano *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1979), together with the finding that the total tumour incidences were similar to those found in previous studies (Tamano *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1979), the inhibitory effects were likely to be of little significance, if any.

Peroxides are widely used as a source of free radicals in various industries. Recently, free radicals have been suggested to play important biological

roles, especially in carcinogenic processes. In fact, some peroxides such as *tert*-butylperoxy benzoate and benzoyl peroxide, which are functionally similar to BBTC, are known to be mutagenic (Mortelmans *et al.*, 1986; Saladino *et al.*, 1985) and carcinogenic (Kotin and Falk, 1963) or co-carcinogenic (Slaga *et al.*, 1981). The hepatotoxicity and haematotoxicity of BBTC were noted in the present subchronic toxicity study, but no nephrotoxicity was observed, despite the finding that cyclohexane and tetramethylcyclohexanes, which have structural resemblances to BBTC, are nephrotoxic in rats (Bernard *et al.*, 1989; Johannsen and Levinskas, 1987). The observed hepatotoxicity could have been caused by the induction of cytochrome *P*-450 enzyme activity, since it has been shown that the structurally similar hexachlorocyclohexane induces this activity in the liver (Popp and Cattley, 1991). Persistent induction of the cytochrome *P*-450 enzyme may give rise to subsequent hepatocarcinogenesis. The haematotoxicity might have been caused primarily by the damage of the haematopoietic organs, although nutritional impairment could, to some extent, contribute to its occurrence. Despite the cytotoxicity in the liver and haematopoietic organs, there were no significant increases caused by BBTC in the incidences of neoplasms in these organs.

It was therefore concluded that BBTC exerts no carcinogenic activity in B6C3F<sub>1</sub> mice. However, while cyclohexane has been suspected as a mutagen from the results of DNA-cell binding assays (Kubinski *et al.*, 1981) and is also known to be a skin tumour promoter in mice, it is not a complete carcinogen (Gupta and Mehrottra, 1990). Thus, although BBTC has been shown not to be mutagenic in the Ames test, the possibility that it can act as a tumour promoter requires further elucidation.

*Acknowledgement*—This work was supported by a Grant-in-Aid for Safety Evaluation of Existing Chemicals from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

#### REFERENCES

- Bernard A. M., de Russus R., Normand J. C. and Lauwerys R. R. (1989) Evaluation of the subacute nephrotoxicity of cyclohexane and other industrial solvents in the female Sprague-Dawley rat. *Toxicology Letters* 45, 271-280.
- Gupta K. P. and Mehrottra N. K. (1990) Mouse skin ornithine decarboxylase induction and tumor promotion by cyclohexane. *Cancer Letters* 51, 227-233.

- Johannsen F. R. and Levinskas G. J. (1987) Acute and subchronic toxicity of tetramethylcyclohexanes. *Journal of Applied Toxicology* 7, 245-248.
- Kotin P. and Falk H. L. (1963) Organic peroxides, hydrogen peroxide, epoxides, and neoplasia. *Radiation Research Supplement* 3, 193-211.
- Kubinski H., Gutzke G. E. and Kubinski Z. O. (1981) DNA-cell binding assay for suspected carcinogens and mutagens. *Mutation Research* 89, 95-136.
- Lijinsky W. and Kovatch R. M. (1986) Chronic toxicity study of cyclohexane in rats and mice. *Journal of the National Cancer Institute* 77, 941-949.
- Mortelmans K., Hawarth S., Lawlor T., Speck W., Tainer B. and Zeiger E. (1986) Salmonella mutagenicity tests. II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environmental Mutagenicity* 8, (Suppl. 7), 1-26.
- Popp J. A. and Cattley R. C. (1991) Hepatobiliary System. In *Handbook of Toxicologic Pathology*. Edited by W. M. Haschek and R. C. Cattley. pp. 279-314. Academic Press, New York.
- Saladino A. J., Willey J. C., Lechner J. F., Grafstrom R. C., LaVeck M. and Harris C. C. (1985) Effects of formaldehyde, benzoyl peroxide, and hydrogen peroxide on cultured normal human bronchial epithelial cells. *Cancer Research* 45, 2522-2526.
- Slaga J. J., Klein-Szanto A. J. P., Triplett L. L. and Yotti L. P. (1981) Skin tumor producing activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical generating compound. *Science* 213, 1023-1024.
- Tamano S., Hagiwara A., Shibata M., Kurata Y., Fukushima S. and Ito N. (1988) Spontaneous tumors in aging (C57BL/6N x C3H/Hen)F<sub>1</sub> (B6C3F<sub>1</sub>) mice. *Toxicologic Pathology* 16, 321-326.
- Ward J. M., Goodman D. G., Squire R. A., Chu K. C. and Linhart M. S. (1979) Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N x C3H/Hen)F<sub>1</sub> mice. *Journal of the National Cancer Institute* 63, 849-854.
- Yamaguchi T. and Yamashita Y. (1980) Mutagenicity of hydroperoxides of fatty acids and some hydrocarbons. *Agricultural Biology and Chemistry* 44, 1675-1678.

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのラットを用いる  
28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test  
of 1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in Rats

要約

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。投与量は雌雄とも0(対照群), 100, 300および1000 mg/kgとし, 0および1000 mg/kg投与群は回復試験の動物を含む1群10匹, 100および300 mg/kg投与群は1群5匹を使用して試験を行った。

その結果, 投与期間中に死亡例はみられなかったが, 回復第3日に1000 mg/kg投与群の雄1例が死亡した。

一般状態の変化としては, 投与第2日以降, 雄では300 mg/kg以上の投与群, 雌では100 mg/kg以上の投与群で, 投与後に一過性の流涎が認められた。また, 1000 mg/kg投与群の雌雄で投与第1週ないし2週の摂餌量が低値を示した。血液学検査では, 1000 mg/kg投与群の雌雄でプロトロンビン時間の延長あるいは延長傾向と活性部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。さらに, 1000 mg/kg投与群の雌では, 血色素量の減少がみられたが, 骨髓像には, 雌雄とも対照群と比較して著しい差は認められなかった。血液生化学検査では, 1000 mg/kg投与群において, ブドウ糖濃度の低下が雄に, GPT活性の上昇が雌雄に,  $\gamma$ -GTP活性の上昇が雌にそれぞれ認められた。また, 雌では, 総蛋白濃度の上昇が1000 mg/kg投与群に, アルブミン濃度の低下が100 mg/kg投与群にそれぞれ認められ, 被験物質投与群では, いずれもA/G比が有意な低値を示した。さらに, 300 mg/kg以上の投与群では, 雌で総コレステロール濃度の上昇がみられ, 雄でトリグリセライド濃度の低下が認められた。器官重量では, 雌雄とも用量に依存して肝臓および腎臓の重量が増加した。その他, 雌の被験物質投与群では, いずれも副腎の絶対重量に増加がみられ, 相対重量においても増加あるいは増加傾向が認められた。投与期間終了時の主な剖検所見としては, 1000 mg/kg投与群の一部の例に, 肝臓の暗色化, 大型化あるいは小葉像の明瞭化が観察された。病理組織学検査では, 肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が, 雄では300 mg/kg以上, 雌では100 mg/kg以上の投与群に観察され, 用量に依存してその程度が増強した。さらに, 肝臓の門脈周囲性の脂肪化が雌では用量に依存して増強した。腎臓では, 雄の被験物質投与群の全例に, 近位尿細管の好酸性細胞質内封入体と好酸性小体が観察され, 好酸性細胞質内封入体の程度は用量に依存して増強した。副腎では, 雌の被験物質投与群の多くの例に束状帯細胞の細胞

質肥大が観察された。

回復第3日の死亡例の主な所見としては, 投与期間終了時と同様な所見に加え, 脳および脊髄の硬膜下, 膀胱, 胸腺, 腸間膜リンパ節, 下顎リンパ節の出血のほか, 精巣, 精巣上体, 前立腺の間質に出血が認められた。

回復期間終了時の検査では, 被験物質投与群の雌雄でヘマトクリット値の減少がみられたほか, 血色素量の減少が雌に, また, 平均赤血球血色素濃度の上昇が雄に認められた。また, 被験物質投与群の雄では, 腎臓の好塩基性尿細管が観察される例が多く, その程度も増強した。しかし, 投与期間終了時にみられた他の変化は消失あるいは軽減する傾向にあった。

以上のことから, 本試験条件下における1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの無影響量は, 雌雄とも100 mg/kg未満であると判断された。

方法

1. 被験物質

被験物質として, 日本油脂(株)(愛知)より提供された1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン(ロット番号:8X01, 純度:97.9%)を用いた。提供された被験物質は, 使用時まで冷蔵保管した。なお, 被験物質の試験期間中の安定性は, 残余被験物質を提供元で再分析することにより確認した。

投与検体は, 用量ごとに被験物質を秤量し, 所定濃度となるようにコーン油(ロット番号:V8P7069, ナカライテスク(株))を加えて溶解して調製した。なお, 初回に調製した各濃度の投与検体の含量測定を実施した結果, 溶液中の被験物質の平均含量は, 所定濃度の96.9~101%であった。また, 動物試験に先立って, 被験物質の2および20 w/v%溶液の安定性を調べたところ, 調製後, 冷蔵, 遮光条件下で12日間は安定であることが確認されたため, 投与検体は1週に1回の割合で調製し, 使用時まで冷蔵, 遮光条件下で保管した。

2. 動物および飼育方法

試験には, 生後4週で購入し, 検査を兼ねて9日間予備飼育した雌雄のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS, 日本チャールス・リバー(株))各30匹を使用した。

群分けは, 検査期間中に異常がなかった動物を用い, 投与開始前日の体重に基づいて体重別層化無作為抽出法

により行った。動物数は、雌雄とも対照群および高用量群を各10匹とし、低および中用量群を各5匹とした。

動物は、温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度50~65%、換気回数約15回/時、照明12時間(7~19時点灯)に設定した飼育室内で、金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア(株))および水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。

### 3. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は、投与量設定のための予備試験の結果に基づき決定した。すなわち、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンを0、500および1000 mg/kgの用量で7日間反復投与することにより、雌雄とも500 mg/kg以上の投与群で、投与直後に一過性の流涎がみられ、1000 mg/kg投与群の雌では、投与初期に体重の軽度な増加抑制が認められたが、その他には被験物質投与に起因したと考えられる明らかな変化は認められなかった。以上のことから、1000 mg/kgは、28日間の反復投与に耐えうる用量であると判断し、本試験の用量は、雌雄とも高用量を1000 mg/kgとし、以下公比約3で除して300および100 mg/kgを中用量および低用量とした。また、雌雄とも媒体であるコーン油を投与する対照群を設けた。

投与経路は強制経口投与とし、1日1回、28日間、ラット用胃管を用いて投与した。投与容量は5 mL/kgとし、投与液量は雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に算出した。なお、回復期間は14日間とした。

### 4. 観察および検査

#### 1) 一般検査

毎日(投与期間中は投与前および投与後)全例の一般状態を観察した。また、体重は、投与第1週に投与第1日の投与直前と4日、投与第2週以降回復期間終了週までは1週に2回の頻度で測定し、その他、投与期間終了日、回復期間終了日および剖検日ならびに死亡時にも測定した。摂餌量は、投与第1週では、投与第1日から2日にかけて1日あたりの摂餌量を測定し、以後回復期間終了週まで毎週1回の頻度で測定した。

#### 2) 尿検査

各群とも生存している全例について、投与第4週および回復第2週に代謝ケージに収容して蓄尿し、約4時間の時点で採尿した。この4時間尿を用いて、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンを試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共(株))により、また色調および濁度を視診により検査した。

#### 3) 血液学検査

投与期間ないし回復期間終了日から翌日の剖検日にかけて定期解剖例全例を18から24時間絶食させ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA 2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス(株))によ

り赤血球数、白血球数、平均赤血球容積、血小板数(以上、電気抵抗法)および血色素量(吸光度法)を測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)を求めた。また、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液をCA-1000(東亜医用電子(株))によりプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間(光散乱検出法)を測定した。さらに、定期解剖例全例の大腸骨骨髓塗抹標本(Wright-Giemsa染色)を作製し、投与期間終了時の対照群および高用量群について骨髓像検査を実施した。

#### 4) 血液生化学検査

血液学検査用の採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシユ・ダイアグノスティックス(株))により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼ・GLDH法)、クレアチニン濃度(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ活性(GSCC法)、GOT活性(IFCC法)、GPT活性(IFCC法)、 $\gamma$ -GTP活性( $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)、トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、カルシウム濃度(OCPC法)を測定し、A/G比を算出した。また、全自動電解質分析装置(EA05, (株)A&T)により、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

#### 5) 病理学検査

上記の採血に引き続き、死亡例を除く全例を放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣または精巣、精巣上体の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓、気管、気管支、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、前立腺、精囊、卵巣、子宮、陰、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、骨格筋(下腿部)、坐骨神経、大腿骨骨髓、膵臓、顎下腺、舌下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚、病変部を0.1 mol/Lリン酸緩衝10 vol%ホルマリン溶液(pH 7.2)に固定し、精巣、精巣上体はブアン液に固定した。心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、精巣、精巣上体、卵巣および病変部はパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、まず、対照群および高用量群について病理組織学検査を実施した。次いで、被験物質投与による影響が疑われた雌雄の肝臓、雄の腎臓および雌の副腎について、全例の病理組織学検査を実施し、さらに、対照群および高用量群の雄の全例の腎臓については、PAS染色標本を作製して病理組織学検査を行った。その他、肉眼的異常が認め

られた器官・組織についても病理組織学検査を実施した。なお、死亡例は器官重量を測定せず、それ以外は屠殺例と同様の病理学検査を実施した。

### 5. 統計解析

体重、摂餌量および定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査ならびに器官重量について、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群が3群以上の場合は、Dunnett法で多重比較を行い、2群の場合には、Studentのt検定ないしAspin-Welchのt検定を行った。さらに、病理組織学検査所見は、グレード分けしたデータについてMann-WhitneyのU検定を、陽性グレードの合計値についてFisher直接確率の片側検定を行った。なお、これら対照群および被験物質投与群との間の有意差検定はいずれの場合も有意水準を5%とした。

## 結果

### 1. 死亡例

投与期間中に死亡例はみられなかったが、回復第3日に1000 mg/kg投与群の雄1例が死亡した。

### 2. 一般状態

投与第2日以降、投与直後の一過性の流涎が、100 mg/kg投与群の雌1例、300 mg/kg投与群の雄1例、雌3例、1000 mg/kg投与群の雄7例、雌9例に認められた。この流涎は、個体によっては投与時の保定の段階でもみられることがあったが、いずれも投与後概ね1時間以内に消失した。回復第3日に死亡した1000 mg/kg投与群の雄1例では、死亡前日から後肢が麻痺し、歩行不能状態となり、鼻周囲の褐色の汚れ、血尿と考えられる赤色

尿の排泄、立毛が観察された。これらの他には、投与期間および回復期間を通して一般状態に変化は認められなかった。

### 3. 体重 (Fig. 1, 2)

観察期間中、被験物質投与群では、雌雄いずれにおいても対照群との間に体重の有意な差は認められなかった。

### 4. 摂餌量 (Fig. 3)

1000 mg/kg投与群の雄では投与第1週に、また、雌では投与第1週および2週に、摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示したが、それ以降いずれの被験物質投与群においても摂餌量に有意な差は認められなかった。

### 5. 尿検査 (Table 1)

投与第4週および回復第2週の検査では、いずれの検査項目においても、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った。

### 6. 血液学検査 (Table 2, 3)

投与期間終了時の1000 mg/kg投与群では、雌にプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。また、雌においても活性部分トロンボプラスチン時間の有意な延長がみられたほか、プロトロンビン時間も延長傾向にあった。さらに、雌では血色素量の有意な減少がみられたほか、白血球分類の好塩基球比率に有意な増加が認められた。骨髓像検査では、1000 mg/kg投与群の雌の組織球比率が増加し、形質細胞比率が減少した。一方、雌雄とも顆粒球系および赤芽球系いずれの比率にも有意な差はないことから、

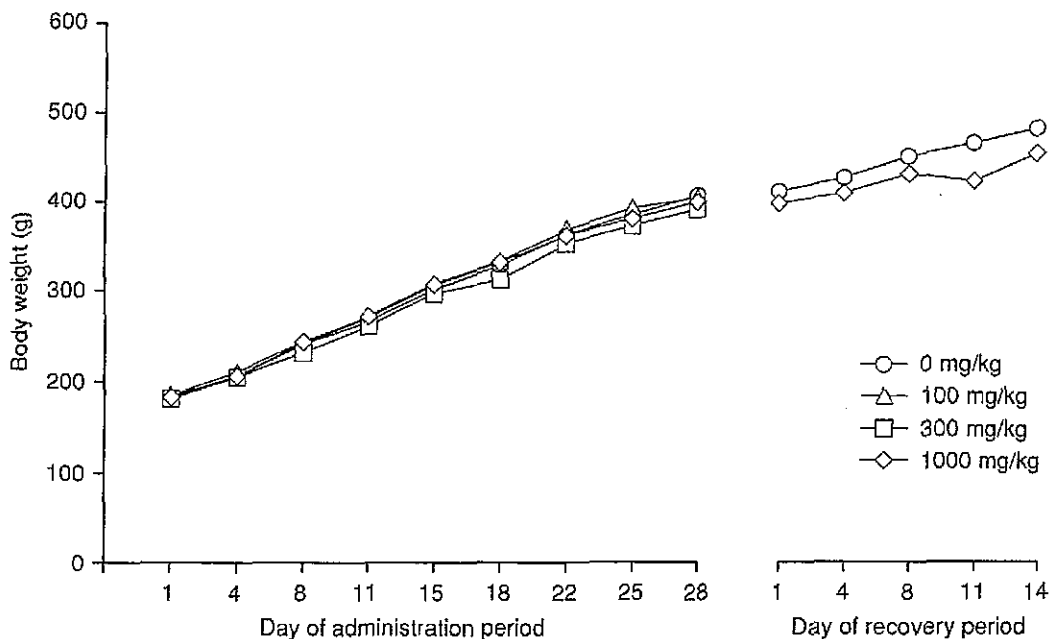


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butylidioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

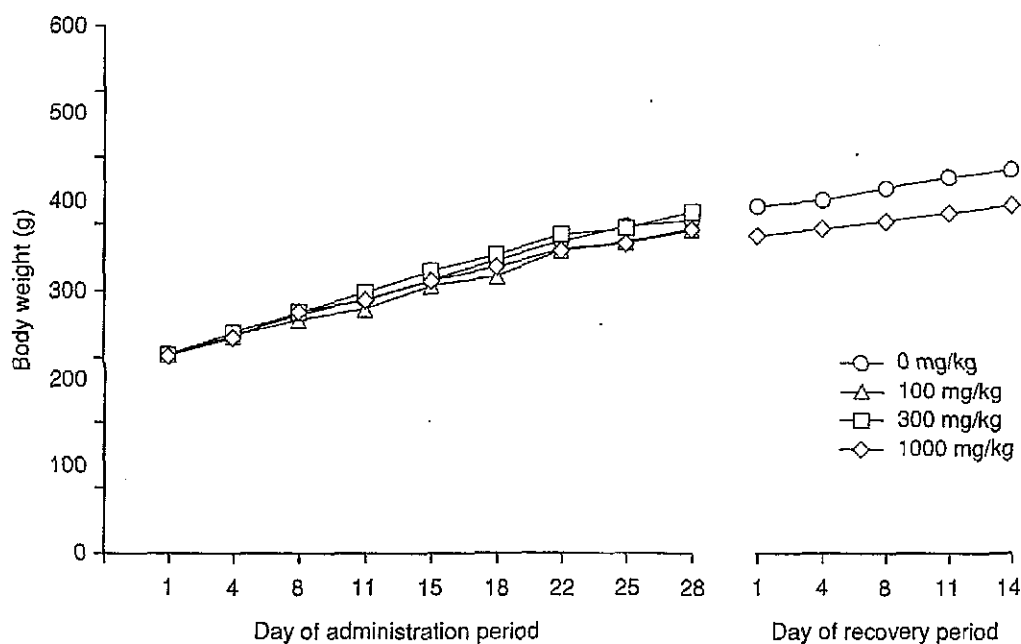


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

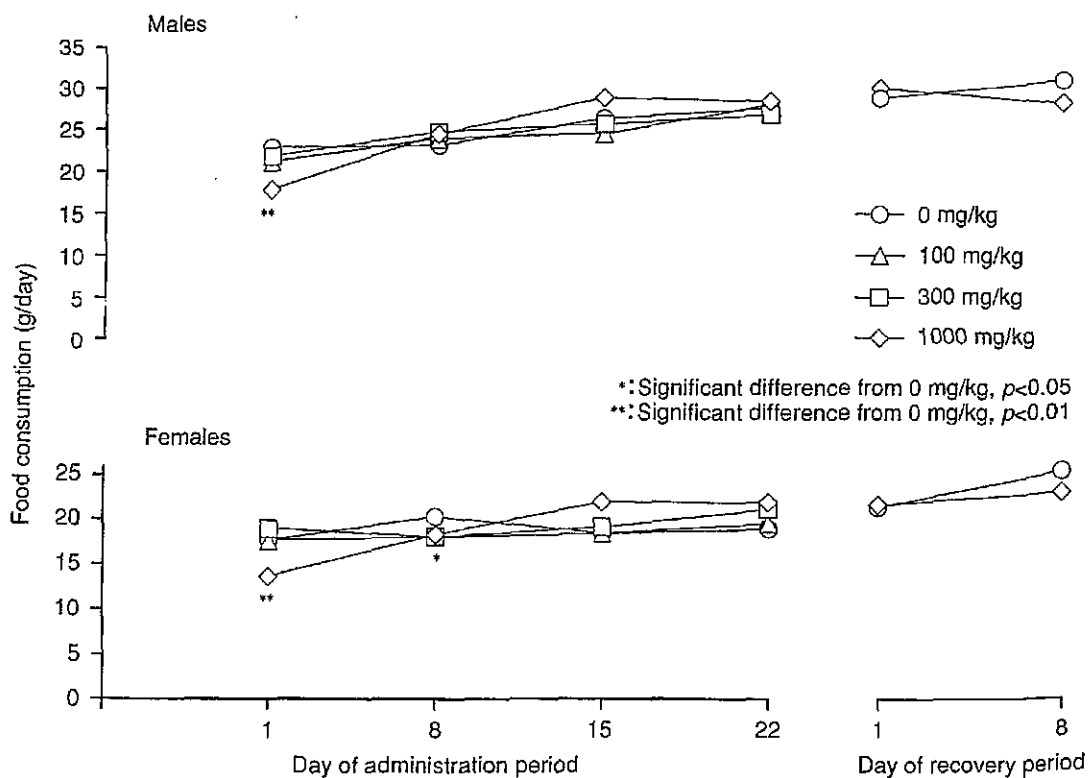


Fig. 3 Food consumption of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

骨髓に対する毒性影響はないと判断し、その他の群では検査を実施しなかった。

回復期間終了時の被験物質投与群では、雌の血色素量に有意な減少が認められたほか、ヘマトクリット値の有

意な減少が雌雄に、また、平均赤血球血色素濃度の有意な上昇が雌に認められた。一方、投与期間終了時にみられた血液凝固時間の延長は、雌雄とも認められなかった。



## 7. 血液生化学検査 (Table 4)

投与期間終了時の1000 mg/kg投与群では、ブドウ糖濃度の有意な低下が雄に、GPT活性の有意な上昇が雌雄に、 $\gamma$ -GTP活性の有意な上昇が雌にそれぞれ認められた。また、雌では、総蛋白濃度の有意な上昇が1000 mg/kg投与群に、アルブミン濃度の有意な低下が100 mg/kg投与群にそれぞれ認められ、雌の被験物質投与群では、いずれもA/G比が有意な低値を示した。さらに、300 mg/kg以上の投与群では、雌に総コレステロール濃度の有意な上昇がみられ、雄にトリグリセライド濃度およびGOT活性の有意な低下が認められた。その他、300 mg/kg投与群の雄では、ナトリウム濃度の有意な上昇とアルカリフォスファターゼ活性の有意な低下が認められた。このうち、300 mg/kg以上の投与群の雄におけるGOT活性の変化は上昇ではなく、低下であること、また、300 mg/kg投与群の雄におけるナトリウム濃度の上昇およびアルカリフォスファターゼ活性の低下は、軽微で、用量に依存した変化ではないことから、いずれも毒性学的意義は乏しいものと考えられる。

回復期間終了時の被験物質投与群では、雄のA/G比が有意な低値を示し、雌でもその値は対照群と比較して低い傾向にあった。その他、被験物質投与群の雌では、無機リン濃度に有意な上昇がみられたが、その値は投与期間終了時の対照群の値と同程度であることから、被験物質投与およびその後続く回復期間に関連のない変化と考えられる。

## 8. 病理学検査

## 1) 肉眼所見

## (1) 投与期間終了時解剖例

1000 mg/kg投与群の雄4例、雌3例では肝臓の暗色化がみられたほか、大型化が雌2例、雌1例に、また、小葉像の明瞭化が雌1例に認められた。腎臓では、腎盂の拡張が300 mg/kg投与群の雄1例に認められた。胃では、前胃壁の肥厚が1000 mg/kg投与群の雄1例に、また、漿膜面の赤色部が1000 mg/kg投与群の雄2例に認められた。その他、直腸中の軟便が1000 mg/kg投与群の雄1例に、また、肺の暗色点も1000 mg/kg投与群の雄1例に認められた。

## (2) 回復期間終了時解剖例

被験物質投与群の雄では、肝臓の淡色点および腎臓の大型化が各1例に認められた。

## (3) 死亡例

回復第3日に死亡した1000 mg/kg投与群の雄では、貧血と少量の血性胸水の貯留があり、脳および脊髄の硬膜下、胸腺、膀胱、精巣、精巣上体、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節に出血がみられ、膀胱内には凝血塊が認められた。その他、胸腺、肝臓および腎臓の大型化、腎盂の拡張、前立腺の暗色化が認められた。

## 2) 器官重量 (Table 5)

投与期間終了時の被験物質投与群では、肝臓および腎臓の重量が用量に依存して増加した。すなわち、肝臓の

絶対重量は、1000 mg/kg投与群の雄および300 mg/kg以上の投与群の雌に、また、相対重量は、300 mg/kg以上の投与群の雄および100 mg/kg以上の投与群の雌に有意な増加が認められた。腎臓の絶対重量は、300 mg/kg以上の投与群の雌に、また、相対重量は、300 mg/kg以上の投与群の雄および1000 mg/kg投与群の雌に有意な増加が認められた。その他、雌の被験物質投与群では、いずれも副腎の絶対重量に有意な増加がみられ、相対重量においても有意な増加あるいは増加傾向が認められた。

回復期間終了時の被験物質投与群では、雌雄の肝臓および腎臓の相対重量に有意な増加がみられた。このほか、雄の脾臓および雌の脳相対重量と、卵巣の絶対および相対重量に有意な増加が認められたが、いずれも投与期間終了時には変化がなく、その程度も軽度であった。

## 3) 病理組織学検査 (Table 6)

## (1) 投与期間終了時解剖例

肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が、雄では300 mg/kg以上の投与群、雌では100 mg/kg以上の投与群に観察され、用量に依存してその程度が増強した。さらに、雌では肝臓の門脈周囲性の脂肪化が被験物質投与群で増強した。腎臓では、雌の被験物質投与群の全例に、近位尿細管の好酸性細胞質内封入体(PAS染色陰性)が観察され、用量に依存してその程度が増強し、さらに、好酸性小体も被験物質投与群の全例に観察された。また、300および1000 mg/kg投与群の雄の各3例には蛋白円柱が認められた。副腎では、雌の各被験物質投与群とも5例中4例に、束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。この他、自然発生性の所見が観察されたが、いずれも対照群と比較してその程度あるいは頻度に有意差のある変化ではなかった。なお、肉眼的に病変がみられた部位の所見として、胃の漿膜面に赤色部が観察された1000 mg/kg投与群の雄2例中1例では、前胃粘膜下織の出血が認められたが、他には組織学的に異常はなかった。

## (2) 回復期間終了時解剖例

被験物質投与群の雄では、腎臓の好塩基性尿細管が観察される例が多く、その程度も増強し、1例には蛋白円柱が認められた。なお、投与期間終了時に被験物質投与群の雌雄にみられた肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大、雄にみられた腎臓の近位尿細管の好酸性細胞質内封入体および雌にみられた副腎の束状帯細胞の細胞質肥大は、回復期間終了時の検査ではいずれも消失あるいは軽減する傾向にあった。

## (3) 死亡例

回復第3日に死亡した1000 mg/kg投与群の雄では、腎臓の近位尿細管の好酸性細胞質内封入体と好酸性小体、好塩基性尿細管、蛋白円柱、鉍質沈着、腎盂拡張、リンパ球浸潤が認められた。また、肝臓では門脈周囲性の脂肪化、小葉中心性の肝細胞肥大、脾臓では髄外造血、褐色色素沈着、副腎では束状帯細胞質の脂肪顆粒の増加が観察された。さらに、脊髄硬膜下、胸腺、膀胱、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節の出血のほか、精巣、精巣上

体、前立腺の間質に出血がみられ、膀胱には好中球の浸潤が認められた。

### 考察

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンを、100, 300および1000 mg/kgの用量で雌雄のSprague-Dawley系ラットに28日間にわたって強制経口投与し、その後14日間の回復期間を設けた。

その結果、一般状態の変化としては流涎が、雄では300 mg/kg以上の投与群に、また、雌では100 mg/kg以上の投与群に認められた。流涎は、個体によっては投与時の保定の段階でみられることがあり、いずれも投与後1時間以内に消失する一過性のものであった。その発症例数は用量に依存し、多くは投与第5日以降にみられ、回復期間中にはみられなかったことから、被験物質による味覚刺激等によって成立した条件反射によるものと考えられる。その他、回復第3日に死亡した1例では、死亡前日から後肢が麻痺し、歩行不能状態となり、血尿と考えられる赤色尿の排泄が観察されたが、後肢の麻痺は、後述する脳および脊髄の硬膜下の出血に起因し、血尿は、膀胱の出血によるものと考えられた。

体重および摂餌量の変化として、1000 mg/kg投与群の雌雄で投与第1週ないし2週の摂餌量が、対照群と比較して低かったが、その後の体重および摂餌量には対照群との間で差は認められず、摂餌量の減少は投与初期のみに認められた変化であった。また、尿検査所見には、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った。したがって、被験物質投与により、体重、摂餌量、尿性状には著しい影響を及ぼさないと考えられる。

血液学検査所見として、1000 mg/kg投与群の雌雄にプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。これらの所見に関連して、回復期間中に死亡した1000 mg/kg投与群の雄1例では、脳および脊髄の硬膜下、胸腺、膀胱など複数の器官に出血がみられた。一方、回復期間終了時の検査では、血液凝固時間の延長はみられなかったことから、これらの所見は可逆的な変化と考えられる。その成因については、後述するように、1000 mg/kg投与群では肝障害が疑われるため、肝臓での血液凝固因子の生成が障害されたことにより、血液凝固時間の延長がみられた可能性が考えられる。回復期間中に死亡した1例でみられた出血も、同様な障害によって生じた可能性も考えられるが、肝障害の程度はいずれも比較的軽度であることから、その詳細は不明である。また、1000 mg/kg投与群の雌では、投与期間終了時の検査で、血色素量の減少が認められた。回復期間終了時の検査では、雌の血色素量に減少がみられたほか、ヘマトクリット値の減少が雌雄に、平均赤血球血色素濃度の上昇が雄に認められた。マウスに1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンを投与すると、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値および平均赤血球容積の減少がみられ、造血系への影響が示唆されている<sup>1)</sup>。しかしながら、本試験の投与期間

終了時の骨髄像検査および脾臓の組織学検査では変化が認められなかったことから、本試験の結果からはその機序を明らかにすることはできなかった。

血液生化学検査所見として、1000 mg/kg投与群では、GPT活性の上昇が雌雄に、また、 $\gamma$ -GTP活性の上昇が雌に、それぞれ認められた。これらは、後述する肝臓の組織所見と関連して、軽度な肝障害がある可能性が示唆された。また、1000 mg/kg投与群の雌に総蛋白濃度の上昇が、また、100 mg/kg投与群の雌にアルブミン濃度の低下が、それぞれ有意な差として認められ、雌の被験物質投与群では、いずれもA/G比が有意な低値を示し、グロブリン濃度の上昇が疑われた。さらに、1000 mg/kg投与群の雄にブドウ糖濃度の低下が認められた。この他、300 mg/kg以上の投与群では、雌に総コレステロール濃度の上昇がみられ、雄にトリグリセライド濃度の低下が認められた。一方、回復期間終了時の検査では、A/G比が被験物質投与群の雄で有意な低値を示し、雌でも対照群と比較して低い傾向にあったが、投与期間終了時にみられたA/G比以外の変化は認められなかった。これらの血液生化学的変化の成因には、肝臓における蛋白合成、脂質代謝あるいは糖代謝の変化が関与している可能性が考えられる。

病理学検査所見として、被験物質投与群では、雌雄とも用量に依存して肝臓の重量が増加し、組織学的には、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が、雄では300 mg/kg以上、雌では100 mg/kg以上の投与群に観察され、用量に依存してその程度が増強した。同様な変化はマウスでも認められ、薬物代謝酵素の誘導が示唆されている<sup>1,2)</sup>。今回の試験では、これらの変化に加えて、肝臓の門脈周囲性の脂肪化が雌の被験物質投与群では用量に依存して増強し、前述のように、1000 mg/kg投与群ではGPT活性あるいは $\gamma$ -GTP活性の上昇が認められたことから、軽度ではあるが肝障害作用も示唆された。なお、肝臓の病理学的所見は、投与期間終了後、14日間の回復期間を経ることにより、消失あるいは軽減する傾向にあった。腎臓では、被験物質投与群で重量が増加し、雄の全例に近位尿管の好酸性細胞質内封入体および好酸性小体が観察され、好酸性細胞質内封入体の程度は用量に依存して増強した。これらの変化に関しては、*tert*-ブチルシクロヘキサンをはじめ、多くの化学物質投与で、雄ラットにおいて同様の好酸性細胞質内封入体が出現する $\alpha_2$ -globulin nephropathyが認められている<sup>3,4)</sup>ことから、本試験においても同様な変化が生じたものと考えられる。一方、回復期間終了時の検査では、これらの変化は消失あるいは対照群との差がなくなり、尿管の再生像とみられる好塩基性尿管が雌の被験物質投与群で頻度および程度とも増強した。したがって、雄ラットでは1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン投与により腎臓に毒性変化が現れるが、投与中止により、回復傾向を示すことが示唆された。また、雌の被験物質投与群でも腎臓重量の増加がみられたが、組織学的には著しい変化は認められず、重量増加の成因は、本試験では明らかにすることはできなかった。副腎では、雌

の被験物質投与群に重量増加がみられ、組織学的には束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。副腎に関する変化は、回復期間終了時には軽減したことから、被験物質投与に起因した変化と考えられるが、その毒性学的意義は不明であった。

以上のように、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの反復投与により、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が雌では100 mg/kg以上、雄では300 mg/kg以上の用量でみられた。雌ではさらに100 mg/kg以上の用量で門脈周囲性の脂肪化の程度が増強したほか、A/G比の低下が認められた。その他、肝臓に関連する所見として、1000 mg/kgの用量では、雌雄で血液凝固時間の延長、GPT活性の上昇等が認められ、肝障害作用が示唆された。また、肝臓の他に、雄では100 mg/kg以上の用量で腎臓の近位尿管に好酸性細胞質内封入体が出現し、腎毒性が示唆され、さらに、雌では100 mg/kg以上の用量で副腎の束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。これらのことから、本試験条件下における1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの無影響量は、雌雄とも100 mg/kg/day未満であると判断された。

#### 文献

- 1) 三井雅之, 古川文夫, 鈴木順子, 榎並倫宣, 西川秋佳, 高橋道人, 衛生試験所報告, **110**, 42(1992).
- 2) M. Mitsui, F. Furukawa, M. Sato, T. Enami, T. Imazawa, A. Nishikawa, M. Takahashi, *Fd Chem. Toxic.*, **31**, 929(1993).
- 3) G. M. Henningsen, K. O. Yu, R. A. Salomon, M. J. Ferry, I. Lopez, J. Roberts, M. P. Servé, *Toxicology Letter*, **39**, 313(1987).
- 4) L. D. Lehman-McKeeman,  $\alpha_2$ u-Globulin Nephropathy, "Comprehensive Toxicology," Volume 7, Renal Toxicology, Vol. ed. by R. S. Goldstein, eds. by I. G. Sipes, C. A. McQueen, A. J. Gandolfi, Elsevier science Ltd., Oxford, 1997, pp.667-692.

#### 連絡先

試験責任者：畔上二郎  
 試験担当者：森村智美, 加藤博康, 関 剛幸,  
 新藤智子, 永田伴子, 吉村慎介,  
 堀内伸二, 稲田浩子, 三枝克彦,  
 安生孝子

財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所  
 〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5  
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

#### Correspondence

Authors: Jiro Azegami (Study Director)  
 Tomomi Morimura, Hiroyasu Katoh,  
 Takayuki Seki, Tomoko Shindo,  
 Tomoko Nagata, Shinsuke Yoshimura,  
 Shinji Horiuchi, Hiroko Inada,  
 Katsuhiko Saegusa, Takako Anjo  
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
 Center  
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,  
 Japan  
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

28日間反復投与毒性試験

Table 1 Urinalysis of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose(mg/kg)	On day 26 of administration period				On day 12 of recovery period		
	0	100	300	1000	0	1000	
<b>Male</b>							
Number of animals	10	5	5	10	5	4	
Color	light yellow	9	5	5	10	5	4
	yellow	1	0	0	0	0	0
Turbidity <sup>a</sup>	±	0	0	0	0	1	0
Protein <sup>b</sup>	±	2	1	0	1	1	1
	+	8	3	4	7	3	3
	++	0	1	1	2	1	0
Ketone <sup>c</sup>	±	6	2	1	4	3	3
	+	0	1	3	2	1	0
Urobilinogen <sup>c</sup>	±	10	5	5	10	5	4
<b>Female</b>							
Number of animals	10	5	5	10	5	5	
Color	light yellow	9	5	5	9	4	5
	yellow	1	0	0	1	1	0
Protein <sup>b</sup>	±	1	0	0	1	0	1
	+	0	1	3	2	1	0
Ketone <sup>c</sup>	±	0	1	2	2	1	0
Urobilinogen <sup>c</sup>	±	10	5	5	10	4	5
	+	0	0	0	0	1	0

a) ±:trace, +:slight b) ±:trace, +:30 mg/dL, ++:100 mg/dL c) ±:0.1 E.U./dL, +:1.0 E.U./dL

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

Table 2 Hematological examination of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose(mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	4
RBC( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	706 $\pm$ 35	683 $\pm$ 27	680 $\pm$ 39	673 $\pm$ 37	795 $\pm$ 32	757 $\pm$ 40
Hemoglobin(g/dL)	14.4 $\pm$ 0.5	14.3 $\pm$ 0.4	14.3 $\pm$ 0.7	14.3 $\pm$ 0.6	15.4 $\pm$ 0.4	15.0 $\pm$ 0.4
Hematocrit(%)	41.8 $\pm$ 1.2	41.0 $\pm$ 1.5	40.7 $\pm$ 2.2	41.0 $\pm$ 1.6	46.2 $\pm$ 1.3	43.1 $\pm$ 1.3**
MCV( $\mu\text{m}^3$ )	59.3 $\pm$ 1.2	60.1 $\pm$ 2.1	59.9 $\pm$ 1.7	61.1 $\pm$ 2.7	58.2 $\pm$ 3.1	57.0 $\pm$ 3.3
MCH(pg)	20.4 $\pm$ 0.6	20.9 $\pm$ 0.8	21.1 $\pm$ 0.7	21.3 $\pm$ 0.7	19.5 $\pm$ 0.8	19.8 $\pm$ 0.9
MCHC(%)	34.5 $\pm$ 0.6	34.8 $\pm$ 0.4	35.3 $\pm$ 0.9	34.7 $\pm$ 0.4	33.4 $\pm$ 0.4	34.8 $\pm$ 0.5**
Reticulocyte(%)	3.0 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.9	2.5 $\pm$ 0.8
Platelet( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	103.1 $\pm$ 7.0	98.2 $\pm$ 8.1	108.4 $\pm$ 6.9	111.0 $\pm$ 4.8	92.5 $\pm$ 7.4	91.8 $\pm$ 9.6
PT(sec)	14.0 $\pm$ 1.4	14.7 $\pm$ 1.6	16.0 $\pm$ 1.8	38.9 $\pm$ 17.9**	14.8 $\pm$ 2.3	12.4 $\pm$ 0.5
APTT(sec)	20.2 $\pm$ 2.3	20.7 $\pm$ 1.6	23.1 $\pm$ 2.2	45.4 $\pm$ 17.0**	18.4 $\pm$ 0.9	18.9 $\pm$ 0.9
WBC( $\times 100/\text{mm}^3$ )	83 $\pm$ 21	80 $\pm$ 11	79 $\pm$ 15	88 $\pm$ 29	87 $\pm$ 12	93 $\pm$ 21
Differential leukocyte counts(%)						
Band neutrophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Segmented neutrophil	8 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2	10 $\pm$ 3	8 $\pm$ 4	9 $\pm$ 4	12 $\pm$ 9
Eosinophil	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2
Lymphocyte	90 $\pm$ 3	91 $\pm$ 2	89 $\pm$ 2	90 $\pm$ 4	89 $\pm$ 5	87 $\pm$ 8
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	701 $\pm$ 15	662 $\pm$ 65	664 $\pm$ 24	678 $\pm$ 20	768 $\pm$ 50	715 $\pm$ 34
Hemoglobin(g/dL)	14.7 $\pm$ 0.3	14.3 $\pm$ 0.7	14.0 $\pm$ 0.4	13.8 $\pm$ 0.4*	15.4 $\pm$ 0.5	14.2 $\pm$ 0.7*
Hematocrit(%)	42.4 $\pm$ 1.3	40.7 $\pm$ 2.9	39.3 $\pm$ 1.0	39.8 $\pm$ 1.8	44.3 $\pm$ 1.6	40.6 $\pm$ 2.0*
MCV( $\mu\text{m}^3$ )	60.4 $\pm$ 2.5	61.6 $\pm$ 1.7	59.2 $\pm$ 2.1	58.8 $\pm$ 2.3	57.8 $\pm$ 2.2	56.8 $\pm$ 1.3
MCH(pg)	21.0 $\pm$ 0.6	21.7 $\pm$ 1.1	21.1 $\pm$ 0.9	20.4 $\pm$ 0.7	20.1 $\pm$ 1.0	19.9 $\pm$ 0.3
MCHC(%)	34.8 $\pm$ 0.9	35.3 $\pm$ 0.9	35.6 $\pm$ 0.3	34.7 $\pm$ 0.7	34.7 $\pm$ 0.7	35.1 $\pm$ 0.8
Reticulocyte(%)	1.6 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 1.4	1.9 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.8	2.2 $\pm$ 0.3
Platelet( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	97.5 $\pm$ 6.4	94.2 $\pm$ 12.8	108.8 $\pm$ 11.6	106.4 $\pm$ 10.8	94.4 $\pm$ 4.1	96.8 $\pm$ 6.0
PT(sec)	11.6 $\pm$ 0.3	11.5 $\pm$ 0.4	11.1 $\pm$ 0.3	15.5 $\pm$ 2.4	11.1 $\pm$ 0.3	11.0 $\pm$ 0.4
APTT(sec)	17.8 $\pm$ 1.2	18.4 $\pm$ 1.7	18.7 $\pm$ 1.4	25.8 $\pm$ 3.4**	16.0 $\pm$ 0.5	16.7 $\pm$ 0.8
WBC( $\times 100/\text{mm}^3$ )	45 $\pm$ 15	49 $\pm$ 12	42 $\pm$ 14	48 $\pm$ 10	54 $\pm$ 17	47 $\pm$ 7
Differential leukocyte counts(%)						
Band neutrophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Segmented neutrophil	10 $\pm$ 6	11 $\pm$ 5	7 $\pm$ 3	8 $\pm$ 5	7 $\pm$ 4	6 $\pm$ 5
Eosinophil	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1*	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	2 $\pm$ 2	3 $\pm$ 3	3 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1
Lymphocyte	87 $\pm$ 7	85 $\pm$ 7	89 $\pm$ 3	89 $\pm$ 5	93 $\pm$ 4	91 $\pm$ 5

Values represent mean  $\pm$  S.D.

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\* : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

28日間反復投与毒性試験

Table 3 Myelogram of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	End of administration period			
	Male		Female	
	Dose (mg/kg)		Dose (mg/kg)	
	0	1000	0	1000
Number of animals	5	5	5	5
Differential bone marrow cell counts (%)				
Total erythroid cells	30.2 ± 5.7	27.0 ± 2.4	24.0 ± 3.1	24.9 ± 8.9
Proerythroblast	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Basophilic erythroblast	4.5 ± 1.3	3.0 ± 1.1	4.1 ± 0.6	3.6 ± 2.0
Plochromatic erythroblast	16.5 ± 3.9	13.9 ± 2.7	10.5 ± 2.0	11.2 ± 3.6
Normoblast	9.1 ± 1.7	10.1 ± 1.7	9.2 ± 0.9	10.0 ± 3.4
Total myeloid cells	41.3 ± 4.6	47.0 ± 7.2	47.3 ± 8.3	43.5 ± 8.6
Myeloblast	2.2 ± 0.3	1.9 ± 0.9	2.4 ± 1.2	1.9 ± 0.7
Promyelocyte	2.0 ± 0.5	2.6 ± 1.3	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.7
Neutrophilic myelocyte	3.5 ± 0.6	3.2 ± 1.2	3.8 ± 1.0	3.4 ± 1.0
Neutrophilic metamyelocyte	10.8 ± 2.5	13.1 ± 2.3	13.8 ± 3.8	10.6 ± 2.3
Neutrophil	19.2 ± 3.7	22.1 ± 3.5	21.0 ± 3.6	20.6 ± 4.9
Eosinophilic myelocyte	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.6	0.9 ± 0.5	1.4 ± 0.7
Eosinophilic metamyelocyte	1.8 ± 0.8	1.8 ± 0.9	2.4 ± 1.0	2.4 ± 0.9
Eosinophil	0.5 ± 0.4	0.8 ± 0.6	1.2 ± 0.5	1.0 ± 0.7
Basophil, all types	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.8
Myeloid/erythroid ratio	1.4 ± 0.4	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.9
Histocyte	3.0 ± 0.9	3.0 ± 1.6	1.9 ± 0.6	3.6 ± 0.8**
Lymphocyte	25.0 ± 4.3	22.4 ± 4.6	25.3 ± 6.2	27.7 ± 4.1
Plasma cell	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.1*
Megakaryocyte	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2
Mast cell	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1

Values represent mean ± S.D.

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\* : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

Table 4 Blood chemical examination of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose(mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	4
Total protein (g/dL)	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.4	5.5 ± 0.4	5.7 ± 0.4
Albumin (g/dL)	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.9 ± 0.3
A/G	1.39 ± 0.26	1.45 ± 0.15	1.37 ± 0.10	1.24 ± 0.13	1.24 ± 0.07	1.02 ± 0.09**
Glucose (mg/dL)	141 ± 13	129 ± 18	121 ± 19	106 ± 19*	143 ± 19	142 ± 10
Total cholesterol (mg/dL)	45 ± 9	44 ± 8	43 ± 9	49 ± 4	44 ± 8	59 ± 15
Triglyceride (mg/dL)	60 ± 10	51 ± 22	31 ± 7**	34 ± 10*	61 ± 22	48 ± 8
BUN (mg/dL)	12 ± 2	12 ± 2	13 ± 3	16 ± 3	17 ± 2	18 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1
Inorg. phos. (mg/dL)	6.8 ± 0.3	7.0 ± 0.4	6.5 ± 0.2	6.6 ± 0.4	7.2 ± 0.6	7.2 ± 0.4
Ca (mg/dL)	8.6 ± 0.2	8.9 ± 0.3	8.8 ± 0.2	8.9 ± 0.4	8.7 ± 0.3	9.0 ± 0.3
Na (mEq/L)	145.2 ± 0.6	145.5 ± 0.9	146.8 ± 1.3*	146.6 ± 1.0	144.5 ± 1.0	143.8 ± 0.6
K (mEq/L)	3.96 ± 0.23	3.95 ± 0.44	3.80 ± 0.13	3.88 ± 0.34	3.78 ± 0.16	3.88 ± 0.16
Cl (mEq/L)	106.0 ± 0.7	105.9 ± 1.6	106.0 ± 1.2	106.3 ± 0.9	106.6 ± 1.1	105.8 ± 1.4
ALP (U/L)	423 ± 45	342 ± 47	286 ± 72**	333 ± 61	318 ± 67	259 ± 20
GPT (U/L)	25 ± 3	24 ± 2	26 ± 1	32 ± 2**	28 ± 4	60 ± 73
GOT (U/L)	60 ± 4	54 ± 4	52 ± 5**	52 ± 2*	61 ± 6	93 ± 75
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.7 ± 0.3**	5.7 ± 0.3	6.0 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.5 ± 0.1	3.1 ± 0.3*	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.3
A/G	2.02 ± 0.12	1.60 ± 0.23**	1.46 ± 0.13**	1.39 ± 0.14***	1.45 ± 0.11	1.26 ± 0.18
Glucose (mg/dL)	116 ± 3	112 ± 4	113 ± 9	112 ± 8	156 ± 12	145 ± 10
Total cholesterol (mg/dL)	54 ± 8	57 ± 7	69 ± 6*	74 ± 8**	71 ± 9	72 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	25 ± 4	25 ± 4	28 ± 6	20 ± 2	38 ± 7	35 ± 8
BUN (mg/dL)	13 ± 3	11 ± 1	12 ± 1	13 ± 1	18 ± 2	21 ± 4
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1
Inorg. phos. (mg/dL)	6.4 ± 0.4	6.1 ± 0.3	5.7 ± 0.4	5.9 ± 0.6	5.7 ± 0.4	6.3 ± 0.4*
Ca (mg/dL)	8.5 ± 0.2	8.4 ± 0.4	8.5 ± 0.3	8.4 ± 0.2	8.9 ± 0.2	8.9 ± 0.2
Na (mEq/L)	144.9 ± 0.8	145.7 ± 0.5	145.6 ± 1.0	145.8 ± 1.7	144.0 ± 0.5	144.3 ± 0.8
K (mEq/L)	3.41 ± 0.12	3.40 ± 0.18	3.36 ± 0.24	3.45 ± 0.24	3.70 ± 0.38	3.44 ± 0.21
Cl (mEq/L)	110.2 ± 1.0	110.4 ± 1.7	109.0 ± 0.9	108.6 ± 1.9	108.8 ± 0.8	108.0 ± 0.9
ALP (U/L)	204 ± 62	197 ± 21	215 ± 48	228 ± 22	206 ± 32	149 ± 57
GPT (U/L)	18 ± 3	20 ± 3	21 ± 3	26 ± 4**	22 ± 3	22 ± 6
GOT (U/L)	49 ± 3	53 ± 4	48 ± 5	50 ± 3	53 ± 6	55 ± 7
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 1	1 ± 0	3 ± 1**	0 ± 0	1 ± 1

Values represent mean ± S.D.

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\* : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

28日間反復投与毒性試験

Table 5 Organ weights of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	4
Body weight (g)	375.8±25.3	380.9±43.7	362.1±27.3	362.7±10.3	447.3±39.6	420.3±41.6
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1886.7±79.9	1938.9±48.4	1947.4±60.2	1943.8±79.8	1987.5±68.9	1936.6±52.1
Thymus	656.7±126.9	730.7±179.9	699.4±204.1	617.3±208.3	522.5±51.0	446.7±63.7
Heart	1211.3±132.4	1182.1±129.9	1232.0±147.0	1122.9±83.0	1327.2±96.6	1294.2±127.8
Liver	12210.8±1086.5	13089.8±2126.3	14086.4±1269.4	17279.6±1331.4**	13337.4±1723.3	14888.1±2627.8
Kidneys	2724.1±275.4	2800.1±227.2	2960.1±235.5	3104.7±304.4	2914.7±147.8	3413.0±495.4
Spleen	823.8±71.9	839.4±142.1	713.3±21.9	664.9±87.7	842.0±183.5	1082.0±271.5
Adrenal glands	52.5±6.5	50.7±6.0	54.0±3.3	47.8±3.5	54.4±18.0	61.5±1.5
Testes	3117.6±213.2	3215.9±271.5	3295.5±236.0	3222.4±243.7	3444.6±171.1	3252.1±242.5
Epididymides	740.6±48.1	769.3±23.9	751.3±63.1	738.7±49.3	1060.6±61.7	1017.6±57.4
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	5.037±0.363	5.149±0.657	5.400±0.403	5.364±0.289	4.468±0.391	4.636±0.388
Thymus	1.750±0.341	1.917±0.398	1.929±0.520	1.697±0.546	1.178±0.183	1.069±0.160
Heart	3.221±0.237	3.106±0.080	3.395±0.205	3.099±0.253	2.975±0.176	3.083±0.165
Liver	32.478±1.488	34.232±1.965	38.929±2.394**	47.605±2.800**	29.735±1.861	35.263±3.317*
Kidneys	7.239±0.379	7.382±0.459	8.195±0.662*	8.551±0.670**	6.548±0.550	8.146±1.052*
Spleen	2.197±0.198	2.207±0.346	1.981±0.194	1.832±0.221	1.878±0.358	2.559±0.465*
Adrenal glands	0.140±0.016	0.135±0.026	0.150±0.018	0.132±0.010	0.121±0.033	0.147±0.016
Testes	8.316±0.657	8.579±1.612	9.143±0.942	8.879±0.521	7.767±1.017	7.773±0.657
Epididymides	1.974±0.122	2.045±0.280	2.088±0.274	2.039±0.162	2.383±0.214	2.429±0.108
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	229.5±17.8	227.5±9.0	240.0±14.8	227.5±19.5	265.2±25.1	240.2±13.4
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1809.0±86.4	1794.3±106.4	1827.3±65.4	1811.1±101.7	1826.3±86.7	1864.1±79.8
Thymus	460.6±77.8	449.2±96.4	621.8±159.6	479.3±84.7	525.2±141.9	378.3±81.4
Heart	792.8±53.5	774.5±62.4	788.9±69.7	770.9±79.0	838.4±61.0	804.6±78.1
Liver	6795.4±624.9	7973.9±292.9	10724.9±112.6*	13379.8±1316.2**	7162.0±824.4	8269.3±690.5
Kidneys	1639.4±103.8	1751.6±92.4	1904.2±60.4**	1946.0±164.1**	1850.4±120.3	1876.2±182.7
Spleen	483.2±42.7	563.8±27.2	587.9±120.0	472.6±47.4	577.8±96.4	522.9±81.4
Adrenal glands	55.3±5.1	67.9±2.2**	67.6±8.8**	73.3±4.1**	67.3±6.9	63.3±5.6
Ovaries	84.7±11.8	87.9±10.8	89.3±14.9	91.1±8.6	84.0±7.4	122.0±29.1*
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	7.915±0.646	7.885±0.314	7.637±0.536	8.000±0.712	6.927±0.648	7.774±0.415*
Thymus	2.010±0.338	1.968±0.376	2.577±0.564	2.097±0.223	1.964±0.424	1.573±0.308
Heart	3.468±0.313	3.403±0.220	3.284±0.108	3.394±0.283	3.170±0.171	3.345±0.198
Liver	29.593±0.909	35.064±1.196**	44.780±2.333**	58.861±3.595**	26.973±1.008	34.398±1.466**
Kidneys	7.178±0.715	7.699±0.318	7.960±0.573	8.565±0.442**	6.996±0.322	7.811±0.621*
Spleen	2.112±0.206	2.479±0.099	2.435±0.375	2.091±0.279	2.180±0.328	2.171±0.269
Adrenal glands	0.242±0.032	0.299±0.015*	0.282±0.032	0.324±0.034**	0.254±0.014	0.263±0.021
Ovaries	0.369±0.049	0.386±0.049	0.372±0.053	0.417±0.064	0.318±0.033	0.506±0.107*

Values represent mean ± S.D.

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\* : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$



1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

Table 6 Histopathological findings of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

	Sex	Male						Female					
		End of administration period				End of recovery period		End of administration period				End of recovery period	
		Dose(mg/kg)	0	100	300	1000	0	1000	0	100	300	1000	0
Number of animals examined (Liver)													
Fatty change, periportal	±	2	5	2	1	2	2	3	1	0	0	3	1
	+	3	0	3	4	2	0	0	2	2	4	0	2
	++	0	0	0	0	1	0	0	2	3	1	0	0
	Total	5	5	5	5	5	2	3	5*	5**	5**	3	3
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	±	0	0	4	2	0	0	0	3	0	0	0	2
	+	0	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	0
	++	0	0	0	1	0	0	0	0	3	5	0	0
	Total	0	0	5**##	5**##	0	0	0	4#	5**##	5**##	0	2
Granuloma	±	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	3
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	4
Number of animals examined (Kidney)													
Inclusion body, intracytoplasmic, eosinophilic, proximal tubule	±	0	0	0	0	1	0	3				3	
	+	0	5	3	0	0	0	0				0	
	++	0	0	2	5	0	0	0				0	
	Total	0	5**##	5**##	5**##	1	0	3				3	
Eosinophilic body, proximal tubule	±	0	3	3	2	2	1	0				0	
	+	0	2	2	3	0	0	0				0	
	Total	0	5**##	5**##	5**##	2	1	0				0	
Basophilic tubule	±	1	1	3	3	1	2	3				3	
	+	2	2	2	1	0	0	0				0	
	++	0	0	0	1	0	2	0				0	
	Total	3	3	5	5	1	4*#	3				3	
Cast, proteinous	±	0	0	3	0	0	0	1				1	
	+	0	0	0	3	0	1	0				0	
	Total	0	0	3	3	0	1	1				1	
Cellular infiltration, lymphocyte	±	4	4	5	3	0	0	2				1	
	+	0	0	0	0	0	0	1				0	
	Total	4	4	5	3	0	0	3				1	
Mineralization, cortico-medullary junction	±	0	0	0	0	0	0	1				2	
	Total	0	0	0	0	0	0	1				2	
Number of animals examined (Adrenal gland)													
Hypertrophy, cytoplasm, zona fasciculata	±	0			0			0	3	2	1	0	1
	+	0			0			0	1	2	3	0	0
	Total	0			0			0	4#	4#	4#	0	1

Grade of histopathological finding; ±: very slight, +: slight, ++: moderate, total: total of positive grade  
 \*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (Two-tailed Mann-Whitney U test)  
 \*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (Two-tailed Mann-Whitney U test)  
 #: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (One-tailed Fisher exact test)  
 ##: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (One-tailed Fisher exact test)

28日間反復投与毒性試験

Table 6 (continue)

	Sex	Male						Female					
		End of administration period				End of recovery period		End of administration period				End of recovery period	
		Dose (mg/kg)	0	100	300	1000	0	1000	0	100	300	1000	0
Number of animals examined		5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
(Spleen)													
Deposit, pigment, brown	±	4			5			2			0		
	+	1			0			3			5		
	Total	5			5			5			5		
Hematopoiesis, extramedullary	±	0			0			5			5		
	+	5			5			0			0		
	Total	5			5			5			5		
Congestion	±	0			0			0			0		
	+	0			1			0			1		
	Total	0			1			0			1		
(Stomach)													
Hemorrhage, submucosa, forestomach	±	0			1			0			0		
	Total	0			1			0			0		

Grade of histopathological finding; ± : very slight, + : slight, total : total of positive grade

18-3. 2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノールの催奇形性試験

Title: Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber

2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in Rats

Authors: Makoto Ema<sup>1</sup>, Katsuhiro Fukunishi<sup>2</sup>, Mariko Matsumoto<sup>1</sup>, Akihiko Hirose<sup>1</sup> and Eiichi Kamata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center,  
National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Kagoshima, Japan

**Keywords** Developmental toxicity, UV absorber, Benzotriazole, Rat

Running head: *Developmental Toxicity of UV Absorber*

Address correspondence to Makoto Ema, Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Fax: +81-3-3700-1408.; E-mail: [ema@nihs.go.jp](mailto:ema@nihs.go.jp)

## **ABSTRACT**

2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB) is widely used as a UV absorber. In this study, the developmental toxicity of DBHCB was evaluated in rats. Pregnant rats were given DBHCB at 0, 62.5, 250 or 1000 mg/kg/day by gavage on days 5-19 of pregnancy. No deaths were observed in the pregnant rats of any group. No effect of DBHCB on the general conditions, body weight gain or feed consumption was observed in the pregnant rats. There were no changes in the ovarian weight, gravid uterine weight or necropsy findings in the maternal rats of the DBHCB-treated groups. No significant effects of DBHCB were found in the number of corpora lutea, implantations, live fetuses, resorptions or dead fetuses, incidence of pre- or postimplantation embryonic loss, viability of fetuses, fetal weight, or sex ratio of live fetuses. No significant difference in the incidence of fetuses with malformations or variations or degree of ossification was detected between the DBHCB-treated and control groups.

## **INTRODUCTION**

2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (CAS No. 3864 99-1; DBHCB) is slightly yellowish powder, stable under ordinary conditions and insoluble in water. Its melting point is 154-158 °C, and its specific gravity is 1.26. This chemical provides effective light stabilization and prevents the yellowing and degradation of polymers such as polypropylene, high density polyethylene, unsaturated polyester, styrene-based thermoplastics elastomer, polyamide and impact polystyrene and is used as UV absorber (Chemical Land21, 2005). The finished polymers, which contained only at levels not to exceed 0.5% by weight of polyethylene phthalate polymers complying with 21 CFR 177.1630 (FDA, 2005a), may be used in contact with some food types and used under certain conditions as described in 21 CFR 176.170 (FDA, 2000; 2005b). UV absorbers are used in food packages as plastic

additives, their function being mainly to prevent polymer degradation and/or a change in the quality of the packed food due to UV rays.

It is anxious that humans have been exposed to these chemicals in occupational surroundings, from environmental contamination and from contamination in food migrated from packages. The possibility of these chemicals entering the biological system has aroused great concern about their toxic potential. Important information can be gained by studying the biological effects produced by environmental chemicals in laboratory animals, in order to investigate their possible influences on human health.

Recently, DBHCB was assessed for its estrogenic activity, using a recombinant yeast assay (Miller et al., 2001) and the yeast two-hybrid assay (Kawamura et al., 2003); it was reported that DBHCB was not estrogenic. Some information on toxicity is available (Everlight Chemical Industrial Corporation, 2002). The oral LD50 for DBHCB was greater than 5000 mg/kg in rats. DBHCB caused minimal irritation to the skin and slight irritation to the eyes in rabbits. A 90-day feeding study of DBHCB in rats, at 22-800 mg/kg, resulted in dose-dependent increases in liver weights and signs of liver toxicity. No effects were found at 3.7 mg/kg. However, no detailed information is available for the toxicity studies.

Although testing for reproductive and developmental toxicity has become an important part of the overall toxicology profile for chemicals, no information has yet been presented on the reproductive and developmental toxicity of DBHCB. Therefore, the present study was conducted to evaluate the developmental toxicity of DBHCB given orally to rats during pregnancy.

## **MATERIALS AND METHODS**

This study was performed in compliance with the OECD Guideline 414 Prenatal Developmental Toxicity Study (OECD, 2001) in 2004 at the Shin Nippon Biomedical

Laboratories, Ltd. (SNBL; Kagoshima, Japan).

## **Animals**

International Genetic Standard (Crj: CD (SD) IGS) rats were used throughout this study. This strain was chosen because it is most commonly used in reproductive and developmental toxicity studies and historical control data are available. Males at 11 weeks of age and females at 10 weeks of age were purchased from Hino Breeding Center, Charles River Japan, Inc. (Yokohama, Japan). The rats were acclimatized to the laboratory for one week prior to the start of the experiment. Male and female rats found to be in good health were selected for use. Animals were reared with a basal diet (CE-2; Clea Co., Ltd., Tokyo, Japan), water was provided ad libitum and the animals were maintained in an air-conditioned room at 21.6-22.2°C, with a relative humidity of 45-58%, a 12-hour light/dark cycle, and ventilation with 15 air charges/hour. Virgin female rats were mated overnight with male rats. The day when the sperm and/or vaginal plug was considered to be day 0 of pregnancy. The copulated females, weighing 245-314 g, 11 weeks old, were distributed on a random basis into 4 groups of 20 rats each and housed individually. This experiment was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of SNBL and performed in accordance with the ethics criteria contained in the bylaws of the committee of SNBL.

## **Chemicals and Dosing**

DBHCB was obtained from Musashino Geigy Co., Ltd. (Kitaibaraki, Japan). The DBHCB (Lot no. 05004IX3) used in this study was 99.9% pure based on HPLC analysis, and it was kept in a dark place at room temperature under airtight conditions. The purity and stability of the chemical were verified by analysis before the study. Rats were treated once daily by gastric intubation with DBHCB at a dosage of 0 (control), 62.5, 250 or 1000 mg/kg

on day 5 through day 19 of pregnancy. The dosage levels were determined based on the results of our dose-finding study in which a significantly increased liver weight was caused in males at 250 mg/kg/day and higher, but not in females even at 1000 mg/kg/day, after administration of DBHCB for 14 days in rats. DBHCB was suspended in 5% gum arabic solution. The volume of each dose was adjusted to 10 ml/kg body weight based on the latest body weight. The control rats were given only 5% gum arabic solution. The stability of the formulations in a dark and cool place under airtight conditions had been confirmed for up to 14 days. During use, the formulations were maintained under such conditions for no more than 7 days and were 97.3 to 100.1% of the target concentration.

### **Observations**

All females were observed daily during the pre-administration period and twice a day (before administration and one to two hours after administration) during the administration period for clinical signs of toxicity. Maternal body weight was recorded on days 0, 5, 8, 11, 14, 17, 19 and 20 of pregnancy. Feed consumption was recorded on days 0-1, 5-6, 8-9, 11-12, 14-15, 17-18 and 19-20 of pregnancy. The pregnant rats were euthanized by exsanguination under ether anesthesia on day 20 of pregnancy. The peritoneal cavity was opened, and the uterus and ovaries were removed from the maternal body and weighed. The numbers of corpora lutea, implantation sites and live and dead fetuses and resorptions were counted. The live fetuses were removed from the uterus and sexed, weighed and inspected for external malformations and malformations within the oral cavity. Approximately one-half of the live fetuses in each litter were randomly selected, fixed in alcohol, stained with alizarin red S (Dawson, 1926) and examined for skeletal anomalies. The remaining live fetuses in each litter were fixed in Bouin's solution. Their heads were subjected to free-hand razor-blade sectioning

(Wilson, 1973), and the thoracic areas were subjected to microdissecting (Nishimura, 1974) to reveal internal abnormalities.

### **Data Analysis**

The statistical analysis of fetuses was carried out using the litter as the experimental unit. The initial body weight, body weight gain and feed consumption of the pregnant rats, numbers of corpora lutea, implantations and live fetuses per litter and fetal weight were analyzed with Bartlett's test (Snedecor and Cochran, 1974) for homogeneity of variance at the 5% level of significance. When the variance was homogeneous, Dunnett's test (Dunnett, 1995) was performed to compare the mean value in the control group with that in each DBHCB group. When the variance was heterogeneous, a Dunnett-type test (Miller, 1987) was performed to compare the mean value in the control group with that in each DBHCB group after rank conversion. The Dunnett type test was used for the incidences of pre- and postimplantation embryonic loss and fetal anomalies and sex ratio of fetuses to compare the mean rank of groups treated with DBHCB and that of the control group. The incidence of dams with anomalous fetuses was analyzed with Fisher's exact test.

### **RESULTS**

Table 1 shows the maternal findings in rats given DBHCB on days 5-19 of pregnancy. No deaths or clinical signs of toxicity were found in female rats of any group. There was no difference in the fertility rate between the control and DBHCB-treated groups. No effects of DBHCB on body weight gains on days 0-5, 5-14, 14-19 and 19-20 of pregnancy were observed. During the whole period of pregnancy, no effects of DBHCB were also detected in body weight gain. There was no difference in feed consumption during pregnancy between the control and DBHCB-treated groups. No effects of DBHCB on weights of the gravid uterus



and ovaries were detected.

The reproductive findings in rats given DBHCB on days 5-19 of pregnancy are presented in Table 2. No totally resorbed litters were found in any group. No effects of DBHCB were observed on the number of corpora lutea or implantations, incidence of pre- or postimplantation loss or the number of live fetuses or the sex ratio of live fetuses. There was no difference in the body weight of male and female fetuses between the control and DBHCB-treated groups. No abnormal findings were noted in the placentae of any group.

Morphological findings in the live fetuses of rats given DBHCB on days 5-19 of pregnancy are shown in Table 3. No fetuses with external malformations were observed in any group. Skeletal examination revealed no fetuses with skeletal malformations in any group. Fetuses with skeletal variations were observed in all groups including the control group. The incidence of fetuses with individual skeletal variations was not increased after the administration of DBHCB. The total number of fetuses with skeletal variations was also not increased in the DBHCB-treated groups. The degree of ossification, as evidenced by the numbers of sacral and caudal vertebrae and sternebrae in the DBHCB-treated groups, was not different from that in the control group. No fetuses with internal malformations were detected in any group. The fetuses with internal variations, such as thymic remnants in the neck, dilated renal pelvis, dilated ureter and/or convoluted ureter, were observed in all groups, including the control group. However, no significant differences in the incidences of the total number of fetuses with internal variations and individual internal variation were found between the control and DBHCB-treated groups.

## **DISCUSSION**

The present study was conducted to determine the prenatal developmental toxicity of DBHCB. The data showed that the prenatal oral administration of DBHCB did not produce

any adverse effects, including morphological anomalies in fetuses of rats.

DBHCB was given to pregnant rats during the time of implantation to the term of pregnancy, to characterize the effects of DBHCB on embryonic/fetal development. The number of implantations was slightly reduced and incidence of preimplantation loss was slightly increased in the high dosage group, a finding associated with the tendency for reduced maternal body weight gain during the administration period, with an increase in maternal body weight gain after completion of the administration period. These differences were probably associated with the variability in litter sizes in the high dosage group and unrelated to the administration of the test chemical. No significant changes in any maternal parameters were noted, even at 1000 mg/kg. No significant changes in embryonic/fetal survival or growth parameters were found, even at 1000 mg/kg. These findings indicate that DBHCB is not toxic to maternal animals, embryonic/fetal survival or fetal growth when administered during the time of implantation to the term of pregnancy.

Morphological examinations in the fetuses of exposed mothers revealed no fetuses with external malformations. However, some fetuses with skeletal and/or internal variations were found in all groups. The variations observed in the present study are of the types that occur spontaneously among the control rat fetuses (Kameyama et al., 1980; Morita et al., 1987; Nakatsuka et al., 1997; Barnett et al., 2000). A skeletal variation, i.e., full supernumerary ribs, has been described as a warning sign of possible teratogenicity and is known to occur in the presence of perturbation of maternal homeostatis. All other variations, short supernumerary ribs, sternebral variations and bilobed centra of the vertebral column, are frequent variations, which were considered to be normal findings (Kimmel and Wilson, 1973). Although several types of skeletal variations, including full supernumerary ribs, were found in the control and DBHCB-treated groups, no consistent tendency was noted in the incidence of fetuses with these alterations. No significant differences between the control and DBHCB-treated groups

were observed in the incidences of the total number of fetuses with skeletal variations or individual types of skeletal variation. Furthermore, these incidences were within the ranges of the background control data in the laboratory performed present study. As for the internal variations, there was an increasing trend, according to the increasing doses, in the total number of fetuses with internal variations and the number of fetuses with dilated renal pelvis or ureter. In the present study, the incidences of fetuses with internal variations, with dilated renal pelvis and with dilated ureter at 1000 mg/kg were 7.5, 2.1 and 5.4%, respectively. In the background control data in the present study, these values were 0-22.4, 0-14.2 and 0-14.2% (Table 3). Because the incidences of fetuses with internal variations were within the range of the historical control data, and there were no statistically significant differences between the control and DBHCB-treated groups, these findings were considered unrelated to DBHCB and simply expression of the normal background incidence of such findings. Chahoud et al. (1999) noted that variations are unlikely to adversely affect the survival or health and this might result from a delay in growth or morphogenesis that has otherwise followed a normal pattern of development. The alterations observed in the present study are not thought to be due to the administration of DBHCB, because they have occurred at a very low incidence and are of types that occur sporadically among control rat fetuses. Consideration of these findings together suggests that the morphological changes in fetuses observed in the present study do not indicate a teratogenic response and that DBCHB possesses no teratogenic potential in rats.

There was no available data for human exposure to this chemical. Actual human exposure to DBCHB may be estimated to be very low, because this chemical was not detected from polyethylenterephthalate bottles in Brazil (Monteiro et al, 1998) and from polyethylene products in Japan (Kawamura et al, 1997). Consideration of these findings and the results of the present study together suggests that the risk of adverse effects of DBHCB on prenatal development of offspring is very low.

## CONCLUSION

The current results showed that the administration of DBHCB to pregnant rats during the time of implantation to the term of pregnancy had no adverse effects on maternal rats and embryonic/fetal development, even at 1000 mg/kg, a limited dose. Based on these findings, it is concluded that the NOAELs of DBHCB for both dams and fetuses were 1000 mg/kg/day in rats.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

## REFERECES

Barnett, J.F., Jr., Lewis, D., Tappen, A., Hoberman, A.M., Christian, M.S. (2000).

Reproductive indices, fetal gross, visceral and skeletal alterations, sexual maturation, passive avoidance and water maze data, a comparison of results in CD(SD)IGS rats and CD(SD) rats. In: Matsuzawa, T., Inoue, H., eds. *Biological Reference Data on CD(SD)IGS Rats-2000*. Yokohama: CD(SD)IGS Study Group, c/o Charles River Japan, Inc., pp. 159-173.

Chahoud, I., Buschmann, J., Clark, R., Druga, A., Falke, H., Faqi, A., Hansen, E.,

Heinrich-Hirsch, B., Helleig, J., Lingk, W., Parkinson, M., Paumgarten, F.J.R., Pefil, R., Platzek, T., Scialli, A.R., Seed, J., Stahlmann, R., Ulbrich, B., Wu, X., Yasuda, M., Younes, M., Solecki, R. (1999). Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. Report of the second workshop on the terminology in developmental

- toxicology Berlin, 27-28 August 1998. *Reprod. Toxicol.* 13: 77-82.
- Chemical Land21 (2005). Benzotriazole Anti UV 327. available at  
<http://www.chemicaland21.com/specialtychem/finechem/BENZOTRIAZOLE%20ANTI%20UV%20327.htm>.
- Dawson, A.B. (1926). A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with arizarin red-S. *Stain Technol.* 1: 123-124.
- Dunnett, C.W. (1996). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with control. *J. Am. Statis. Assoc.* 50: 1096-1121.
- Everlight Chemical Industrial Corporation (2002). EVERSORB 75. *Safety Data Sheet*.
- FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2000). Definitions of food types and conditions of use for food contact substances. available at  
<http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-fcn3.html>
- FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2005a). Inventory of effective premarket notifications for food contact substances. available at  
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-fcn.html>
- FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2005b). Inventory of premarket notification limitations, specifications, and use for food contact substances. available at  
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-fcn2.html>
- Kameyama, Y., Tanimura, T., Yasuda, M., Eds. (1980). Spontaneous malformations in laboratory animals-photographic atlas and reference data. *Cong. Anom.* 20: 25-106.
- Kawamura, Y., Ogawa, Y., Nishimura, T., Kikuchi, Y., Nishikawa, J., Nishihara, T., Tanamoto, K. (2003). Estrogenic activities of UV stabilizers used in feed contact plastics and benzophenone derivatives tested by the yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.* 49: 205-212.
- Kawamura, Y., Miura, M., Sugita, T., Tamada, T. (1997). Residue and release of antioxidants

and ultraviolet stabilizers in polyethylene products in contact with foodstuffs.

*SHOKUHINN EISEIGAKU ZASSHI* 38, 27-33.

Kimmel, C.A., Wilson, G.J. (1973). Skeletal deviations in rats: Malformations or variations?

*Teratology* 8: 309-316.

Miller, D., Wheals, B.B., Beresford, N., Sumpter, J.P. (2001). Estrogenic activity of phenolic additives determined by an in vitro yeast bioassay. *Environ. Health Perspect.* 109:

133-138.

Miller, R.G., Jr. (1987). *Simultaneous Statistical Inference, 2nd ed.* Berlin: Springer-Verlag.

Monteiro, M., Rubio, C.N., Reyes, F.G.R. (1998). A GC/MS method for detecting UV stabilizers in polyethyleneterephthalate bottles. *J. High Resol. Chromatogr.* 21, 317-320.

Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Hasegawa, Y., Miyamoto, M., Watanabe, T. (1987). Spontaneous malformations in laboratory animals: frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. *Cong. Anom.* 27: 147-206.

Nakatsuka, T., Horimoto, M., Ito, M., Matsubara, Y., Akaike, M., Ariyuki, F. (1997). Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA) survey on background control data of developmental and reproductive toxicity studies in rats, rabbits and mice. *Cong. Anom.* 37: 47-138.

Nishimura, K. (1974). A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. *Cong. Anom.* 14: 23-40.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (2001). OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for Updating Guideline 414. Prenatal Developmental Toxicity study.

Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd. (XXXX). Guidance for Animal Care and

Use. Snedecor, G.W., Cochran, W.G. (1980). *Statistical Methods, 7th ed.* Ames, Iowa State University Press.

Wilson J.G. (1973). Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In Wilson, J.G., Warkany, J., eds. *Teratology: Principles and Techniques*. Chicago: The University of Chicago Press, pp. 262-277.

**Table 1:** Maternal findings in rats given DBHCB on days 5-19 of pregnancy.

Dose (mg/kg)	0 (control)	62.5	250	1000
No. of rats	20	20	20	20
No. of pregnant rats	17	18	17	18
No. of dead rats	0	0	0	0
Initial body weight	285 ± 11	280 ± 12	285 ± 18	288 ± 11
Body weight gain during pregnancy (g) <sup>a</sup>				
Days 0-5	30 ± 8	33 ± 5	31 ± 6	30 ± 6
Days 5-14	47 ± 7	44 ± 7	49 ± 5	43 ± 9
Days 14-19	71 ± 9	65 ± 10	67 ± 10	63 ± 12
Days 19-20	16 ± 6	17 ± 4	20 ± 5	18 ± 5
Days 0-20	163 ± 17	159 ± 19	167 ± 14	154 ± 20
Adjusted weight gain <sup>b</sup>	88 ± 9	88 ± 10	91 ± 10	82 ± 18
Feed consumption during pregnancy (g/day) <sup>a</sup>				
Days 0-1	24 ± 3	23 ± 3	23 ± 3	24 ± 4
Days 5-6	27 ± 3	27 ± 3	27 ± 3	27 ± 3
Days 8-9	28 ± 4	28 ± 3	28 ± 3	28 ± 2
Days 11-12	29 ± 4	29 ± 3	28 ± 2	29 ± 3
Days 14-15	28 ± 4	28 ± 3	28 ± 3	28 ± 3
Days 17-18	32 ± 4	30 ± 4	31 ± 3	31 ± 4
Days 19-20	29 ± 4	29 ± 3	31 ± 4	30 ± 3
Weight of gravid uterus (g) <sup>a</sup>	88 ± 9	88 ± 10	91 ± 10	82 ± 18
Weight of ovaries (mg) <sup>a</sup>	149 ± 21	137 ± 14	149 ± 19	139 ± 14

<sup>a</sup> Values are given as the mean ± SD.

<sup>b</sup> Adjusted weight gain refers to maternal weight gain excluding the gravid uterus.



**Table 2:** Reproductive findings in rats given DBHCB on days 5-19 of pregnancy.

Dose (mg/kg)	0 (control)	62.5	250	1000	Historical control values <sup>d</sup>
No. of litters	17	18	17	18	652 (48 studies)
No. of litters totally resorbed	0	0	0	0	
No. of corpora lutea per litter <sup>a</sup>	16.9± 2.0	16.3 ± 1.1	17.1 ± 1.7	16.6 ± 1.9	13.8-17.5
No. of implantations per litter <sup>a</sup>	16.2± 1.4	15.8 ± 1.1	16.6 ± 1.6	15.1 ± 3.4	13.1-16.3
% Preimplantation loss per litter <sup>b</sup>	3.8	3.0	2.3	9.4	0.9-13.6
% Postimplantation loss per litter <sup>c</sup>	4.9	3.3	4.0	6.3	0-11.5
No. of live fetuses per litter <sup>a</sup>	15.4± 1.5	15.3 ± 1.3	16.0 ± 1.8	14.2 ± 3.6	12.4-15.5
Sex ratio of live fetuses (male/total)	0.51	0.47	0.48	0.48	0.38-0.59
Body weight of live fetuses (g) <sup>a</sup>					
Male	3.88± 0.22	3.87 ± 0.30	3.92 ± 0.19	4.00 ± 0.26	3.56-4.01
Female	3.68± 0.19	3.69 ± 0.31	3.70 ± 0.14	3.79 ± 0.29	3.33-3.81

<sup>a</sup> Values are given as the mean ± SD.

<sup>b</sup> (No. of preimplantation embryonic loss/no. of corpora lutea) x 100.

<sup>c</sup> (No. of resorptions and dead fetuses/no. implantations) x 100.

<sup>d</sup> Historical control values were obtained from the studies performed in SNBL during 1996-2004 using Crj: CD (SD) IGS rats.

**Table 3:** Morphological examinations in fetuses of rats given DBHCB on days 5-19 of pregnancy.

Dose (mg/kg)	0 (control)	62.5	250	1000	Historical control values <sup>b</sup>
<b>External examination</b>					
Total no. of fetuses (litters) examined	262 (17)	275 (18)	272 (17)	255 (18)	9178 (652): 48 studies
Total no. of fetuses (litters) with malformations	0	0	0	0	0-0.8%
<b>Skeletal examination</b>					
Total no. of fetuses (litters) examined	136 (17)	141 (18)	141 (17)	132 (18)	3741 (516): 29 studies
Total no. of fetuses (litters) with malformations	0	0	0	0	0-1.3%
Total no. of fetuses (litters) with variations	18 (7)	12 (10)	11 (8)	17(11)	3.6-19.2%
Asymmetry of sternbrae	1	1	0	0	0-2.8%
Dumbbell ossification of thoracic centrum	1	3 (3)	2 (1)	2(2)	0-5.5%
Splitting of thoracic centrum	0	0	0	1	0-3.0%
Full supernumerary ribs	0	0	1	0	0-4.4%
Short supernumerary ribs	16 (6)	8 (6)	9 (7)	14(8)	0.3-17.1%
Short 13 <sup>th</sup> ribs	0	0	0	1	0%
<b>Degree of ossification<sup>a</sup></b>					
No. of sacral and caudal vertebrae	8.0 ± 0.4	8.0 ± 0.5	8.2 ± 0.4	8.1 ± 0.3	7.5-8.4
No. of sternbrae	5.4 ± 0.5	5.5 ± 0.6	5.7 ± 0.3	5.4 ± 0.5	4.7-5.7
<b>Internal examination</b>					
Total no. of fetuses (litters) examined	126 (17)	134 (18)	131 (17)	123 (18)	3459 (510): 30 studies
Total no. of fetuses (litters) with malformations	0	0	0	0	0-0.8%
Total no. of fetuses (litters) with variations	2 (2)	5 (4)	8 (6)	10(6)	0-22.4%
Thymic remnants in neck	1	2 (2)	2 (2)	3(3)	0-10.0%
Dilated renal pelvis	0	0	3 (2)	3(2)	0-14.2%
Dilated ureter	1	3 (2)	6 (4)	7(4)	0-14.2%
Convulsed ureter	0	0	0	1	0-3.8%

<sup>a</sup> Values are given as the mean  $\pm$  SD.

<sup>b</sup> Historical control values were obtained from the studies performed in SNBL during 1996-2004 using Crj: CD (SD) IGS rats.

## 別添 B

## Tables

1-1	Clinical signs in males (Administration period)	46
1-2	Clinical signs in females (Administration period)	47
1-3	Clinical signs in males (Recovery period)	48
1-4	Clinical signs in females (Recovery period)	49
2-1	Body weight of males	50
2-2	Body weight gain of males	51
2-3	Body weight of females – Before mating	52
2-4	Body weight gain of females – Before mating	53
2-5	Body weight of dams (F0) – Gestation period	54
2-6	Body weight gain of dams (F0) – Gestation period	55
2-7	Body weight of dams (F0) – Lactation period	56
2-8	Body weight gain of dams (F0) – Lactation period	57
3-1	Food consumption in males	58
3-2	Food consumption in females – Before mating	59
3-3	Food consumption in dams (F0) – Gestation period	60
3-4	Food consumption in dams (F0) – Lactation period	61
4	Mating performance	62
5	Abbreviations of hematology parameters	63
5-1	Hematology in males (End of drug administration)	64
5-2	Hematology in females (End of drug administration)	65
5-3	Hematology in males (End of recovery test)	66
5-4	Hematology in females (End of recovery test)	67
6	Abbreviations of blood chemistry parameters	68
6-1	Blood chemistry in males (End of drug administration)	69
6-2	Blood chemistry in females (End of drug administration)	70
6-3	Blood chemistry in males (End of recovery test)	71
6-4	Blood chemistry in females (End of recovery test)	72
7-1	Gross pathological findings in males (End of drug administration)	73
7-2	Gross pathological findings in females (End of drug administration)	74
7-3	Gross pathological findings in males (End of recovery test)	75
7-4	Gross pathological findings in females (End of recovery test)	76

8	Abbreviations of organ weights	77
8-1	Organ weight in males (End of drug administration)	78
8-2	Organ weight in females (End of drug administration)	79
8-3	Organ weight in males (End of recovery test)	80
8-4	Organ weight in females (End of recovery test)	81
8-5	Relative organ weight in males (End of drug administration)	82
8-6	Relative organ weight in females (End of drug administration)	83
8-7	Relative organ weight in males (End of recovery test)	84
8-8	Relative organ weight in females (End of recovery test)	85
9-1	Histopathological findings in males [H.E. staining] (End of drug administration)	86
9-2	Histopathological findings in females [H.E. staining] (End of drug administration)	88
9-3	Histopathological findings in males [Testis, PAS-Hematoxylin staining] (End of drug administration)	90
9-4	Histopathological findings in animals [Liver, H.E. staining] (End of drug administration)	91
10-1	Clinical signs in pups (F1) – Lactation period	92
10-2	External findings at birth (F1)	93
11	Development of pups (F1) up to Day 4 after birth	94
12	Body weight of pups (F1) – Lactation period	95
13	Gross pathological findings in pups (F1) at Day 4 after birth	96

Table 1-1 Clinical signs in males

Study No. : SBL75-31

( Administration period )

Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
No. of animals	15	10	10	15
Normal	15	10	10	15

Table 1-2 Clinical signs in females ( Administration period )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
Before mating				
No. of animals	15	10	10	15
Normal	15	10	10	15
Mating period				
No. of animals	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10
Gestation period				
No. of animals	9	9 <sup>1)</sup>	10	10
Normal	9	9	10	10
Lactation period				
No. of animals	9	10	10	10
Normal	9	10	10	10

1): Except an animal in which copulation was not confirmed.

Table 1-3 Clinical signs in males

Study No. : SBL75-31

( Recovery period )

Dose (mg/kg)	Control	250
No. of animals	5	5
Normal	5	5



Table 1-4 Clinical signs in females

Study No. : SBL75-31

( Recovery period )

Dose (mg/kg)	Control	250
No. of animals	5	5
Normal	5	5

Table 2-1 Body weight of males ( mean  $\pm$  S.D. , g )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Day	Control	2.5	25	250
( Administration period )				
0	187.9 $\pm$ 4.3 (15)	187.0 $\pm$ 4.6 (10)	185.2 $\pm$ 3.7 (10)	187.7 $\pm$ 6.0 (15)
3	213.4 $\pm$ 6.9 (15)	212.4 $\pm$ 5.9 (10)	212.0 $\pm$ 5.7 (10)	215.3 $\pm$ 7.6 (15)
7	245.9 $\pm$ 9.8 (15)	246.8 $\pm$ 7.5 (10)	245.6 $\pm$ 7.9 (10)	248.5 $\pm$ 11.2 (15)
10	270.8 $\pm$ 13.2 (15)	270.9 $\pm$ 9.4 (10)	267.5 $\pm$ 14.7 (10)	272.1 $\pm$ 14.7 (15)
14	299.5 $\pm$ 15.9 (15)	299.3 $\pm$ 13.1 (10)	293.4 $\pm$ 20.0 (10)	301.4 $\pm$ 18.9 (15)
17	319.1 $\pm$ 18.0 (15)	316.4 $\pm$ 15.1 (10)	310.8 $\pm$ 24.8 (10)	319.0 $\pm$ 20.3 (15)
21	340.6 $\pm$ 20.4 (15)	339.9 $\pm$ 17.9 (10)	332.6 $\pm$ 28.4 (10)	341.5 $\pm$ 23.5 (15)
24	358.1 $\pm$ 22.3 (15)	355.7 $\pm$ 19.6 (10)	346.5 $\pm$ 30.9 (10)	356.6 $\pm$ 24.2 (15)
28	377.1 $\pm$ 24.0 (15)	374.9 $\pm$ 22.4 (10)	364.2 $\pm$ 35.9 (10)	373.7 $\pm$ 26.0 (15)
31	385.2 $\pm$ 24.7 (15)	386.2 $\pm$ 24.8 (10)	368.9 $\pm$ 36.5 (10)	380.5 $\pm$ 28.1 (15)
35	402.8 $\pm$ 25.3 (15)	403.1 $\pm$ 24.4 (10)	383.6 $\pm$ 36.4 (10)	394.7 $\pm$ 30.9 (15)
38	412.4 $\pm$ 25.0 (15)	415.4 $\pm$ 26.4 (10)	395.3 $\pm$ 38.2 (10)	406.4 $\pm$ 31.6 (15)
42	428.7 $\pm$ 26.5 (15)	432.4 $\pm$ 25.5 (10)	413.0 $\pm$ 40.7 (10)	421.1 $\pm$ 32.1 (15)
45	438.7 $\pm$ 27.5 (15)	442.3 $\pm$ 27.5 (10)	421.9 $\pm$ 40.1 (10)	430.7 $\pm$ 35.2 (15)
49	449.6 $\pm$ 30.5 (15)	452.2 $\pm$ 29.3 (10)	430.7 $\pm$ 39.3 (10)	439.3 $\pm$ 34.9 (15)
52	455.8 $\pm$ 31.5 (15)	459.5 $\pm$ 30.6 (10)	438.8 $\pm$ 41.2 (10)	444.7 $\pm$ 34.4 (15)
( Recovery period )				
56	480.0 $\pm$ 23.7 ( 5)			468.6 $\pm$ 30.1 ( 5)
59	489.6 $\pm$ 22.4 ( 5)			477.6 $\pm$ 29.1 ( 5)
63	499.0 $\pm$ 23.1 ( 5)			485.4 $\pm$ 28.6 ( 5)
66	505.6 $\pm$ 19.8 ( 5)			493.2 $\pm$ 25.6 ( 5)
70	474.2 $\pm$ 22.8 ( 5)			457.0 $\pm$ 25.2 ( 5)

Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.  
 Not significantly different from the control group by t-test.

Day 70 : Animals that were fasted

Table 2-2 Body weight gain of males ( mean  $\pm$  S.D. , g )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Day	Control	2.5	25	250
( Administration period )				
0- 3	25.5 $\pm$ 3.3 (15)	25.4 $\pm$ 2.9 (10)	26.8 $\pm$ 3.0 (10)	27.7 $\pm$ 2.9 (15)
3- 7	32.5 $\pm$ 3.9 (15)	34.4 $\pm$ 2.8 (10)	33.6 $\pm$ 4.2 (10)	33.1 $\pm$ 4.6 (15)
7-10	24.9 $\pm$ 5.4 (15)	24.1 $\pm$ 4.8 (10)	21.9 $\pm$ 7.5 (10)	23.7 $\pm$ 5.3 (15)
10-14	28.7 $\pm$ 4.9 (15)	28.4 $\pm$ 5.7 (10)	25.9 $\pm$ 6.6 (10)	29.3 $\pm$ 5.4 (15)
14-17	19.5 $\pm$ 4.1 (15)	17.1 $\pm$ 3.7 (10)	17.4 $\pm$ 5.2 (10)	17.6 $\pm$ 3.8 (15)
17-21	21.5 $\pm$ 3.9 (15)	23.5 $\pm$ 5.3 (10)	21.8 $\pm$ 4.3 (10)	22.5 $\pm$ 4.3 (15)
21-24	17.5 $\pm$ 4.0 (15)	15.8 $\pm$ 2.9 (10)	13.9 $\pm$ 3.8 (10)	15.1 $\pm$ 4.6 (15)
24-28	19.1 $\pm$ 4.0 (15)	19.2 $\pm$ 4.5 (10)	17.7 $\pm$ 6.4 (10)	17.1 $\pm$ 5.6 (15)
28-31	8.1 $\pm$ 5.8 (15)	11.3 $\pm$ 4.2 (10)	4.7 $\pm$ 5.0 (10)	6.8 $\pm$ 4.7 (15)
31-35	17.6 $\pm$ 4.3 (15)	16.9 $\pm$ 2.0 (10)	14.7 $\pm$ 4.2 (10)	14.1 $\pm$ 4.5 (15)
35-38	9.6 $\pm$ 2.3 (15)	12.3 $\pm$ 5.3 (10)	11.7 $\pm$ 3.8 (10)	11.7 $\pm$ 4.0 (15)
38-42	16.3 $\pm$ 4.7 (15)	17.0 $\pm$ 3.2 (10)	17.7 $\pm$ 5.1 (10)	14.7 $\pm$ 6.0 (15)
42-45	9.9 $\pm$ 5.5 (15)	9.9 $\pm$ 5.0 (10)	8.9 $\pm$ 1.9 (10)	9.6 $\pm$ 4.2 (15)
45-49	10.9 $\pm$ 5.4 (15)	9.9 $\pm$ 4.3 (10)	8.8 $\pm$ 4.3 (10)	8.7 $\pm$ 3.2 (15)
49-52	6.2 $\pm$ 4.1 (15)	7.3 $\pm$ 3.3 (10)	8.1 $\pm$ 3.3 (10)	5.4 $\pm$ 4.3 (15)
52-56	11.6 $\pm$ 4.7 ( 5)			10.8 $\pm$ 6.1 ( 5)
( Recovery period )				
56-59	9.6 $\pm$ 2.2 ( 5)			9.0 $\pm$ 5.4 ( 5)
59-63	9.4 $\pm$ 5.5 ( 5)			7.8 $\pm$ 5.4 ( 5)
63-66	6.6 $\pm$ 4.8 ( 5)			7.8 $\pm$ 5.1 ( 5)
66-70	-31.4 $\pm$ 3.6 ( 5)			-36.2 $\pm$ 7.3 ( 5)

Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.  
 Not significantly different from the control group by t-test.

Day 70 : Animals that were fasted

Table 2-3 Body weight of females - Before mating ( mean  $\pm$  S.D. , g )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Day	Control	2.5	25	250
( Administration period )				
0	151.9 $\pm$ 6.3 (15)	154.7 $\pm$ 7.5 (10)	153.8 $\pm$ 5.4 (10)	153.1 $\pm$ 7.0 (15)
3	163.5 $\pm$ 7.3 (15)	165.1 $\pm$ 9.4 (10)	165.4 $\pm$ 6.9 (10)	163.8 $\pm$ 7.5 (15)
7	175.8 $\pm$ 9.8 (15)	177.1 $\pm$ 11.6 (10)	178.9 $\pm$ 10.5 (10)	176.9 $\pm$ 10.2 (15)
10	186.7 $\pm$ 12.3 (15)	188.4 $\pm$ 14.7 (10)	192.4 $\pm$ 10.8 (10)	187.5 $\pm$ 10.3 (15)
14	197.2 $\pm$ 15.4 (15)	201.6 $\pm$ 18.3 (10)	204.8 $\pm$ 12.8 (10)	198.6 $\pm$ 11.7 (15)
17	205.0 $\pm$ 16.2 (15)	209.3 $\pm$ 19.0 (10)	214.1 $\pm$ 14.0 (10)	206.4 $\pm$ 12.7 (15)
21	215.7 $\pm$ 18.2 (15)	224.4 $\pm$ 20.9 (10)	226.3 $\pm$ 12.7 (10)	219.3 $\pm$ 13.8 (15)
24	223.5 $\pm$ 19.5 (15)	232.0 $\pm$ 21.7 (10)	232.8 $\pm$ 13.0 (10)	226.7 $\pm$ 14.0 (15)
28	233.2 $\pm$ 20.9 (15)	243.0 $\pm$ 23.3 (10)	243.5 $\pm$ 12.3 (10)	237.2 $\pm$ 15.3 (15)
31	238.6 $\pm$ 22.7 ( 5)			246.4 $\pm$ 17.3 ( 5)
35	247.0 $\pm$ 23.3 ( 5)			254.8 $\pm$ 16.8 ( 5)
38	251.4 $\pm$ 29.2 ( 5)			258.4 $\pm$ 18.5 ( 5)
42	256.6 $\pm$ 27.0 ( 5)			266.6 $\pm$ 18.7 ( 5)
45	261.8 $\pm$ 27.5 ( 5)			273.8 $\pm$ 18.0 ( 5)
49	265.6 $\pm$ 27.4 ( 5)			277.6 $\pm$ 18.4 ( 5)
52	270.0 $\pm$ 22.5 ( 5)			281.6 $\pm$ 20.5 ( 5)
( Recovery period )				
56	277.2 $\pm$ 22.8 ( 5)			288.2 $\pm$ 15.7 ( 5)
59	280.6 $\pm$ 23.9 ( 5)			292.8 $\pm$ 18.3 ( 5)
63	285.2 $\pm$ 22.4 ( 5)			298.0 $\pm$ 15.9 ( 5)
66	285.8 $\pm$ 26.5 ( 5)			305.4 $\pm$ 17.8 ( 5)
70	268.2 $\pm$ 21.4 ( 5)			283.0 $\pm$ 17.5 ( 5)

Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.  
 Not significantly different from the control group by t-test.

Day 70 : Animals that were fasted

Table 2-4 Body weight gain of females - Before mating ( mean  $\pm$  S.D. , g )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Day	Control	2.5	25	250
( Administration period )				
0- 3	11.7 $\pm$ 3.5 (15)	10.4 $\pm$ 3.7 (10)	11.6 $\pm$ 3.9 (10)	10.7 $\pm$ 3.3 (15)
3- 7	12.3 $\pm$ 3.6 (15)	12.0 $\pm$ 3.8 (10)	13.5 $\pm$ 5.1 (10)	13.1 $\pm$ 4.3 (15)
7-10	10.9 $\pm$ 4.1 (15)	11.3 $\pm$ 4.3 (10)	13.5 $\pm$ 4.6 (10)	10.6 $\pm$ 2.8 (15)
10-14	10.5 $\pm$ 4.3 (15)	13.2 $\pm$ 5.7 (10)	12.4 $\pm$ 4.2 (10)	11.1 $\pm$ 2.8 (15)
14-17	7.8 $\pm$ 3.5 (15)	7.7 $\pm$ 4.5 (10)	9.3 $\pm$ 3.2 (10)	7.8 $\pm$ 5.2 (15)
17-21	10.7 $\pm$ 4.3 (15)	15.1 $\pm$ 3.8* (10)	12.2 $\pm$ 3.6 (10)	12.9 $\pm$ 4.2 (15)
21-24	7.8 $\pm$ 3.2 (15)	7.6 $\pm$ 3.9 (10)	6.5 $\pm$ 3.7 (10)	7.5 $\pm$ 4.4 (15)
24-28	9.7 $\pm$ 2.7 (15)	11.0 $\pm$ 4.1 (10)	10.7 $\pm$ 2.9 (10)	10.5 $\pm$ 3.5 (15)
28-31	3.8 $\pm$ 3.1 ( 5)			6.0 $\pm$ 4.8 ( 5)
31-35	8.4 $\pm$ 2.6 ( 5)			8.4 $\pm$ 1.5 ( 5)
35-38	4.4 $\pm$ 6.1 ( 5)			3.6 $\pm$ 4.5 ( 5)
38-42	5.2 $\pm$ 2.6 ( 5)			8.2 $\pm$ 3.1 ( 5)
42-45	5.2 $\pm$ 4.4 ( 5)			7.2 $\pm$ 5.1 ( 5)
45-49	3.8 $\pm$ 2.8 ( 5)			3.8 $\pm$ 4.2 ( 5)
49-52	4.4 $\pm$ 5.6 ( 5)			4.0 $\pm$ 5.7 ( 5)
52-56	7.2 $\pm$ 2.2 ( 5)			6.6 $\pm$ 5.0 ( 5)
( Recovery period )				
56-59	3.4 $\pm$ 2.6 ( 5)			4.6 $\pm$ 3.4 ( 5)
59-63	4.6 $\pm$ 3.0 ( 5)			5.2 $\pm$ 3.5 ( 5)
63-66	0.6 $\pm$ 4.3 ( 5)			7.4 $\pm$ 4.3 ( 5)
66-70	-17.6 $\pm$ 6.0 ( 5)			-22.4 $\pm$ 3.2 ( 5)

\* P<0.05 : Significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.  
Not significantly different from the control group by t-test.

Day 70 : Animals that were fasted

Table 2-5 Body weight of dams (F0) - Gestation period ( mean  $\pm$  S.D. , g )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Days of gestation	Control	2.5	25	250
0	237.8 $\pm$ 22.9 ( 9 )	248.1 $\pm$ 17.6 ( 9 )	247.5 $\pm$ 13.6 (10)	241.0 $\pm$ 16.2 (10)
7	273.2 $\pm$ 27.4 ( 9 )	284.1 $\pm$ 20.8 ( 9 )	281.3 $\pm$ 14.6 (10)	280.5 $\pm$ 17.1 (10)
14	311.9 $\pm$ 28.0 ( 9 )	326.0 $\pm$ 23.9 ( 9 )	321.8 $\pm$ 14.8 (10)	321.1 $\pm$ 22.9 (10)
20	392.6 $\pm$ 35.2 ( 9 )	405.0 $\pm$ 28.0 ( 9 )	396.3 $\pm$ 19.8 (10)	398.7 $\pm$ 34.6 (10)

( ) : No. of dams

Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test

Table 2-6

Body weight gain of dams (F0) - Gestation period ( mean  $\pm$  S.D. , g )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Days of gestation	Control	2.5	25	250
0- 7	35.4 $\pm$ 7.7 ( 9 )	36.0 $\pm$ 6.6 ( 9 )	33.8 $\pm$ 5.4 (10)	39.5 $\pm$ 7.2 (10)
7-14	38.7 $\pm$ 8.2 ( 9 )	41.9 $\pm$ 5.9 ( 9 )	40.5 $\pm$ 5.8 (10)	40.6 $\pm$ 7.1 (10)
14-20	80.7 $\pm$ 12.6 ( 9 )	79.0 $\pm$ 9.7 ( 9 )	74.5 $\pm$ 10.5 (10)	77.6 $\pm$ 15.4 (10)

( ) : No. of dams

Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test

Table 2-7

Body weight of dams (F0) - Lactation period ( mean  $\pm$  S.D. ; g )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Days after delivery	Control	2.5	25	250
0	281.0 $\pm$ 28.6 ( 9 )	293.3 $\pm$ 28.2 (10)	287.2 $\pm$ 15.1 (10)	294.2 $\pm$ 19.0 (10)
3	306.4 $\pm$ 33.8 ( 9 )	311.6 $\pm$ 23.8 (10)	313.3 $\pm$ 20.2 (10)	313.5 $\pm$ 15.5 (10)
4	276.9 $\pm$ 36.5 ( 9 )	281.6 $\pm$ 31.2 (10)	280.1 $\pm$ 20.2 (10)	280.3 $\pm$ 17.0 (10)

( ) : No. of dams

Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test

Day 4 : Animals that were fasted



Table 2-8 Body weight gain of dams (F0) - Lactation period ( mean  $\pm$  S.D. , g ) Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Days after delivery	Control	2.5	25	250
0- 3	25.4 $\pm$ 12.4 ( 9)	18.3 $\pm$ 11.4 (10)	26.1 $\pm$ 10.5 (10)	19.3 $\pm$ 7.9 (10)
3- 4	-29.6 $\pm$ 7.0 ( 9)	-30.0 $\pm$ 9.2 (10)	-33.2 $\pm$ 7.0 (10)	-33.2 $\pm$ 7.1 (10)

( ) : No. of dams

Not significantly different from the control group by Dunnett's type test / Dunnett's test

Day 4 : Animal that were fasted

Table 3-1 Food consumption in males ( mean  $\pm$  S.D. , g/day )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Day	Control	2.5	25	250
( Administration period )				
0- 1	23.9 $\pm$ 2.0 (15)	24.3 $\pm$ 1.9 (10)	24.0 $\pm$ 1.8 (10)	24.7 $\pm$ 2.1 (15)
3- 4	26.3 $\pm$ 2.5 (15)	25.7 $\pm$ 2.7 (10)	25.8 $\pm$ 1.9 (10)	25.7 $\pm$ 1.7 (15)
7- 8	27.9 $\pm$ 2.5 (15)	26.6 $\pm$ 3.0 (10)	27.9 $\pm$ 3.6 (10)	27.9 $\pm$ 2.3 (15)
10-11	30.0 $\pm$ 3.3 (15)	27.9 $\pm$ 2.6 (10)	27.8 $\pm$ 4.1 (10)	30.5 $\pm$ 3.2 (15)
14-15	28.4 $\pm$ 3.5 (15)	25.8 $\pm$ 2.5 (10)	27.4 $\pm$ 3.7 (10)	28.5 $\pm$ 3.5 (15)
17-18	29.3 $\pm$ 3.2 (15)	27.3 $\pm$ 1.8*	27.3 $\pm$ 3.7 (10)	29.7 $\pm$ 1.8 (15)
21-22	30.4 $\pm$ 2.7 (15)	28.9 $\pm$ 3.0 (10)	27.6 $\pm$ 3.5 (10)	29.9 $\pm$ 2.5 (15)
24-25	29.5 $\pm$ 3.2 (15)	29.4 $\pm$ 3.2 (10)	28.6 $\pm$ 3.4 (10)	29.7 $\pm$ 1.8 (15)
28-29	33.2 $\pm$ 1.8 ( 5)	( 0)	( 0)	30.4 $\pm$ 1.5* ( 5)
31-32	32.2 $\pm$ 2.9 ( 5)	( 0)	( 0)	30.4 $\pm$ 2.9 ( 5)
35-36	29.6 $\pm$ 1.5 ( 5)	( 0)	( 0)	30.2 $\pm$ 2.0 ( 5)
38-39	33.0 $\pm$ 2.3 ( 5)	( 0)	( 0)	30.6 $\pm$ 3.2 ( 5)
42-43	31.4 $\pm$ 1.8 ( 5)	( 0)	( 0)	32.2 $\pm$ 2.4 ( 5)
45-46	33.8 $\pm$ 2.6 ( 5)	( 0)	( 0)	32.0 $\pm$ 3.7 ( 5)
49-50	27.0 $\pm$ 2.5 ( 5)	( 0)	( 0)	28.4 $\pm$ 4.7 ( 5)
52-53	29.2 $\pm$ 1.5 ( 5)	( 0)	( 0)	30.2 $\pm$ 2.0 ( 5)
( Recovery period )				
56-57	31.6 $\pm$ 1.9 ( 5)	( 0)	( 0)	32.2 $\pm$ 2.4 ( 5)
59-60	30.0 $\pm$ 1.0 ( 5)	( 0)	( 0)	32.0 $\pm$ 1.0 ( 5)
63-64	33.2 $\pm$ 0.8 ( 5)	( 0)	( 0)	32.4 $\pm$ 2.7 ( 5)
66-67	31.8 $\pm$ 2.2 ( 5)	( 0)	( 0)	32.0 $\pm$ 3.1 ( 5)

( ) : No. of animals

\* P&lt;0.05 : Significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.

Not significantly different from the control group by t-test.

Table 3-2 Food consumption in females - Before mating ( mean  $\pm$  S.D. , g/day )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Day	Control	2.5	25	250
( Administration period )				
0- 1	18.0 $\pm$ 2.3 (15)	17.8 $\pm$ 1.8 (10)	18.8 $\pm$ 2.1 (10)	18.5 $\pm$ 2.2 (15)
3- 4	19.0 $\pm$ 2.2 (15)	19.6 $\pm$ 3.9 (10)	19.8 $\pm$ 1.9 (10)	19.9 $\pm$ 3.3 (15)
7- 8	19.6 $\pm$ 2.6 (15)	20.6 $\pm$ 3.0 (10)	20.2 $\pm$ 1.6 (10)	19.0 $\pm$ 2.6 (15)
10-11	20.4 $\pm$ 2.6 (15)	20.9 $\pm$ 4.9 (10)	19.4 $\pm$ 2.3 (10)	20.1 $\pm$ 3.3 (15)
14-15	19.0 $\pm$ 2.1 (15)	17.9 $\pm$ 3.2 (10)	19.0 $\pm$ 2.8 (10)	19.1 $\pm$ 2.3 (15)
17-18	19.9 $\pm$ 4.0 (15)	19.3 $\pm$ 2.4 (10)	21.4 $\pm$ 1.8 (10)	21.2 $\pm$ 2.7 (15)
21-22	20.3 $\pm$ 3.7 (15)	20.2 $\pm$ 2.9 (10)	21.1 $\pm$ 1.9 (10)	20.1 $\pm$ 2.1 (15)
24-25	19.9 $\pm$ 3.1 (15)	22.2 $\pm$ 4.7 (10)	21.9 $\pm$ 3.5 (10)	21.6 $\pm$ 3.5 (15)
28-29	21.0 $\pm$ 2.3 ( 5)	( 0)	( 0)	19.8 $\pm$ 3.4 ( 5)
31-32	19.4 $\pm$ 1.3 ( 5)	( 0)	( 0)	22.4 $\pm$ 2.1* ( 5)
35-36	19.8 $\pm$ 1.3 ( 5)	( 0)	( 0)	21.0 $\pm$ 1.2 ( 5)
38-39	21.0 $\pm$ 2.0 ( 5)	( 0)	( 0)	24.0 $\pm$ 2.6 ( 5)
42-43	21.8 $\pm$ 2.2 ( 5)	( 0)	( 0)	21.6 $\pm$ 2.2 ( 5)
45-46	22.4 $\pm$ 4.2 ( 5)	( 0)	( 0)	22.2 $\pm$ 2.0 ( 5)
49-50	19.2 $\pm$ 4.2 ( 5)	( 0)	( 0)	19.8 $\pm$ 3.9 ( 5)
52-53	20.0 $\pm$ 2.3 ( 5)	( 0)	( 0)	21.2 $\pm$ 1.6 ( 5)
( Recovery period )				
56-57	21.0 $\pm$ 1.9 ( 5)	( 0)	( 0)	23.8 $\pm$ 2.4 ( 5)
59-60	22.6 $\pm$ 2.6 ( 5)	( 0)	( 0)	22.0 $\pm$ 2.5 ( 5)
63-64	22.4 $\pm$ 2.5 ( 5)	( 0)	( 0)	23.4 $\pm$ 2.1 ( 5)
66-67	22.4 $\pm$ 2.5 ( 5)	( 0)	( 0)	23.0 $\pm$ 1.2 ( 5)

( ) : No. of animals

\* P<0.05 : Significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.  
Not significantly different from the control group by t-test.

Table 3-3 Food consumption in dams (F0) - Gestation period ( mean  $\pm$  S.D. , g/day ) Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Days of gestation	Control	2.5	25	250
0- 1	20.9 $\pm$ 3.9 ( 9 )	20.8 $\pm$ 2.1 ( 9 )	20.3 $\pm$ 3.1 (10)	20.8 $\pm$ 3.3 (10)
3- 4	22.6 $\pm$ 5.3 ( 9 )	24.6 $\pm$ 3.8 ( 9 )	24.8 $\pm$ 2.7 (10)	26.1 $\pm$ 2.5 (10)
6- 7	25.3 $\pm$ 3.5 ( 9 )	26.1 $\pm$ 2.0 ( 9 )	24.3 $\pm$ 2.9 (10)	26.6 $\pm$ 2.2 (10)
10-11	26.7 $\pm$ 3.6 ( 9 )	28.0 $\pm$ 2.7 ( 9 )	27.7 $\pm$ 1.9 (10)	28.2 $\pm$ 2.3 (10)
14-15	26.1 $\pm$ 3.0 ( 9 )	28.2 $\pm$ 4.5 ( 9 )	28.1 $\pm$ 2.1 (10)	25.9 $\pm$ 2.5 (10)
17-18	29.4 $\pm$ 2.9 ( 9 )	28.7 $\pm$ 3.0 ( 9 )	30.1 $\pm$ 2.7 (10)	29.8 $\pm$ 2.4 (10)
19-20	27.1 $\pm$ 3.8 ( 9 )	27.7 $\pm$ 3.5 ( 9 )	28.2 $\pm$ 2.5 (10)	29.1 $\pm$ 2.7 (10)

( ) : No. of dams  
 Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test

Table 3-4 Food consumption in dams (F0) - Lactation period ( mean  $\pm$  S.D. , g/day ) Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) Days after delivery	Control	2.5	25	250
0- 1	13.8 $\pm$ 8.9 ( 9)	12.8 $\pm$ 7.4 (10)	12.9 $\pm$ 9.8 (10)	15.0 $\pm$ 8.7 (10)
2- 3	38.1 $\pm$ 5.2 ( 9)	33.7 $\pm$ 4.2 (10)	35.5 $\pm$ 8.6 (10)	34.2 $\pm$ 4.4 (10)

( ) : No. of dams

Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test

Table 4 Mating performance

Study No. : SBL75-31

Dose : (mg/kg)		Control	2.5	25	250
No. of pairs used for mating	(a)	10	10	10	10
No. of pairs with successful copulation	(b)	9	10	10	10
Copulatory index (%)	(b/a)	90.0	100.0	100.0	100.0
Mean copulatory interval (days , mean±S.D.)		4.9±4.4	3.4±3.8	2.7±1.3	2.8±1.5
No. of fertile pairs	(c)	9	10	10	10
Fertility index (%)	(c/b)	100.0	100.0	100.0	100.0

Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.  
Not significantly different from the control group by Fisher's exact test.

Table 5 Abbreviations of hematology parameters

## Hematology

RBC	( $10^6/\text{mm}^3$ )	Number of red blood cells
WBC	( $10^3/\text{mm}^3$ )	Number of white blood cells
Ht	(%)	Hematocrit value
Hb	(g/dL)	Hemoglobin concentration
Plat.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	Number of blood platelets
MCV	(fL)	Mean corpuscular volume
MCH	(pg)	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	(g/dL)	Mean corpuscular hemoglobin concentration
Ret.(%)	(%)	Reticulocyte ratio
Hemogram		
Eosino.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	Number of eosinophilic leukocytes
Eosino.	(%)	Eosinophilic leukocyte ratio
Baso.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	Number of basophilic leukocytes
Baso.	(%)	Basophilic leukocyte ratio
Mono.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	Number of monocytes
Mono.	(%)	Monocyte ratio
Lymph.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	Number of lymphocytes
Lymph.	(%)	Lymphocyte ratio
Neutro.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	Number of neutrophilic leukocytes
Neutro.	(%)	Neutrophilic leukocyte ratio
LUC	( $10^3/\text{mm}^3$ )	Number of large unstained cells
LUC	(%)	Large unstained cell ratio
Blood coagulation test		
PT	(Sec)	Prothrombin time
APTT	(Sec)	Activated partial thromboplastin time

Table 5-1

Hematology in males (End of drug administration)

Study No. : SBL75-31

Dose(mg/kg)		Control	2.5	25	250
N		5	5	5	5
RBC	( $10^6/\text{mm}^3$ )	8.184±0.323	7.946±0.307	8.068±0.304	7.634±0.364*
WBC	( $10^3/\text{mm}^3$ )	9.414±1.059	8.218±2.935	8.102±2.368	8.936±1.133
Ht	(%)	45.56±1.90	44.32±0.91	44.68±2.24	42.70±1.68
Hb	(g/dL)	15.24±0.38	14.86±0.54	15.12±0.86	14.22±0.70
Plat.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	1063.2±109.9	1145.2±134.1	1201.8±119.3	1204.8±107.7
MCV	(fL)	55.70±2.34	55.84±1.45	55.36±0.86	55.94±0.72
MCH	(pg)	18.66±0.70	18.68±0.79	18.72±0.43	18.60±0.27
MCHC	(g/dL)	33.54±0.69	33.50±0.71	33.82±0.37	33.26±0.44
Ret.	(%)	2.60±0.34	2.74±0.57	3.00±0.40	3.02±0.44
Eosino.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.102±0.036	0.118±0.024	0.072±0.028	0.106±0.032
Eosino.	(%)	1.08±0.42	1.62±0.70	0.88±0.13	1.22±0.38
Baso.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.018±0.004	0.016±0.009	0.014±0.005	0.012±0.004
Baso.	(%)	0.18±0.04	0.16±0.09	0.16±0.05	0.12±0.04
Mono.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.158±0.078	0.114±0.025	0.100±0.062	0.148±0.008
Mono.	(%)	1.64±0.61	1.58±0.73	1.20±0.35	1.68±0.30
Lymph.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	8.064±0.827	6.770±2.978	6.486±2.114	7.050±1.135
Lymph.	(%)	85.78±2.26	80.58±7.34	79.64±3.66	78.64±4.29
Neutro.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.990±0.238	1.124±0.345	1.360±0.299	1.512±0.277*
Neutro.	(%)	10.48±1.99	14.96±5.91	17.30±3.71	17.18±4.23
LUC	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.082±0.008	0.078±0.024	0.068±0.040	0.104±0.078
LUC	(%)	0.86±0.05	1.10±0.51	0.82±0.43	1.10±0.74
PT	(Sec)	8.52±0.42	9.50±0.97	9.20±0.57	8.50±0.58
APTT	(Sec)	20.10±0.77	20.94±0.65	18.34±0.98**	18.18±0.71**

Values are expressed as the mean + S.D.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  : significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.



Table 5-2 Hematology in females (End of drug administration)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)		Control	2.5	25	250
N		5	5	5	5
RBC	( $10^6/\text{mm}^3$ )	6.810±0.489	6.904±0.360	6.816±0.138	6.500±0.243
WBC	( $10^3/\text{mm}^3$ )	5.952±0.959	6.188±1.379	6.344±1.463	5.050±0.711
Ht	(%)	40.16±2.06	41.08±1.68	39.40±1.19	39.58±2.33
Hb	(g/dL)	13.38±0.66	13.98±0.75	13.14±0.36	13.36±0.77
Plat.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	1468.0±237.3	1517.6±44.2	1496.0±207.7	1502.6±156.5
MCV	(fL)	59.08±2.35	59.58±1.84	57.80±2.12	60.90±1.46
MCH	(pg)	19.70±0.82	20.26±0.46	19.28±0.65	20.54±0.50
MCHC	(g/dL)	33.34±0.21	34.00±0.59	33.40±0.73	33.74±0.37
Ret.	(%)	6.48±2.55	4.88±1.04	4.48±1.28	6.28±2.55
Eosino.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.068±0.019	0.048±0.019	0.038±0.016*	0.038±0.018*
Eosino.	(%)	1.10±0.31	0.82±0.32	0.62±0.24	0.74±0.35
Baso.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.004±0.005	0.008±0.004	0.010±0.007	0.000±0.000
Baso.	(%)	0.08±0.04	0.10±0.07	0.10±0.07	0.08±0.04
Mono.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.088±0.053	0.058±0.027	0.078±0.036	0.072±0.044
Mono.	(%)	1.44±0.78	0.96±0.32	1.18±0.30	1.38±0.86
Lymph.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	3.702±0.766	4.614±1.065	4.634±1.454	3.408±0.151
Lymph.	(%)	61.98±4.94	74.58±6.18	71.96±8.38	68.72±11.35
Neutro.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	2.052±0.302	1.432±0.505	1.546±0.352	1.500±0.766
Neutro.	(%)	34.74±4.38	23.08±5.78	25.52±8.49	28.50±11.13
LUC	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.038±0.015	0.030±0.007	0.036±0.015	0.032±0.013
LUC	(%)	0.66±0.24	0.50±0.12	0.60±0.23	0.58±0.23
PT	(Sec)	7.38±0.29	7.28±0.19	7.42±0.27	6.94±0.32
APTT	(Sec)	18.56±1.19	19.14±1.92	18.82±0.25	14.74±3.36

Values are expressed as the mean ± S.D.

\* P&lt;0.05 : Significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.

Table 5-3

Hematology in males (End of recovery test)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)		Control	2.5	25	250
N		5	0	0	5
RBC	( $10^6/\text{mm}^3$ )	8.866±0.544			8.342±0.406
WBC	( $10^3/\text{mm}^3$ )	8.506±1.532			9.516±1.568
Ht	(%)	47.26±2.39			45.66±1.12
Hb	(g/dL)	15.76±0.74			15.10±0.32
Plat.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	1081.0±73.3			1406.4±218.2*
MCV	(fL)	53.36±1.25			54.86±3.31
MCH	(pg)	17.80±0.46			18.14±0.95
MCHC	(g/dL)	33.36±0.17			33.06±0.69
Ret.	(%)	2.44±0.38			2.80±0.16
Eosino.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.100±0.052			0.092±0.031
Eosino.	(%)	1.16±0.55			0.98±0.45
Baso.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.008±0.004			0.016±0.009
Baso.	(%)	0.10±0.07			0.18±0.08
Mono.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.116±0.041			0.174±0.046
Mono.	(%)	1.40±0.56			1.82±0.39
Lymph.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	7.398±1.397			7.982±1.372
Lymph.	(%)	86.86±1.17			83.78±1.86*
Neutro.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.784±0.164			1.176±0.214*
Neutro.	(%)	9.26±1.49			12.42±1.86*
LUC	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.094±0.064			0.078±0.038
LUC	(%)	1.18±0.83			0.82±0.27
PT	(Sec)	14.84±3.34			15.70±2.71
APTT	(Sec)	23.98±1.48			25.48±1.23

Values are expressed as the mean + S.D.

\* P&lt;0.05 : Significantly different from the control group by t-test / Wilcoxon test.

Table 5-4

Hematology in females (End of recovery test)

Study No. : SBL75-31

Dose(mg/kg)		Control	2.5	25	250
N		5	0	0	5
RBC	( $10^6/\text{mm}^3$ )	8.074±0.449			8.112±0.157
WBC	( $10^3/\text{mm}^3$ )	3.446±0.317			3.514±0.780
Ht	(%)	45.00±1.78			44.54±0.58
Hb	(g/dL)	15.40±0.66			15.30±0.39
Plat.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	1113.2±77.9			1037.4±91.2
MCV	(fL)	55.78±1.08			54.94±0.52
MCH	(pg)	19.10±0.37			18.82±0.16
MCHC	(g/dL)	34.20±0.35			34.28±0.52
Ret.	(%)	2.32±0.42			2.08±0.43
Eosino.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.064±0.015			0.056±0.015
Eosino.	(%)	1.80±0.45			1.66±0.74
Baso.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.000±0.000			0.000±0.000
Baso.	(%)	0.06±0.05			0.04±0.05
Mono.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.066±0.017			0.062±0.019
Mono.	(%)	1.92±0.45			1.74±0.50
Lymph.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	2.634±0.281			2.834±0.698
Lymph.	(%)	76.78±7.95			80.34±4.18
Neutro.	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.652±0.295			0.542±0.157
Neutro.	(%)	18.64±7.31			15.60±3.83
LUC	( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.028±0.015			0.022±0.008
LUC	(%)	0.74±0.34			0.62±0.24
PT	(Sec)	7.70±0.38			7.36±0.09
APTT	(Sec)	18.04±0.86			17.58±0.19

Values are expressed as the mean + S.D.

Not significantly different from the control group by t-test / Wilcoxon test.

Table 6 Abbreviations of blood chemistry parameters

Study No.SBL75-31

Blood Chemistry

ASAT	(IU/L)	Aspartate aminotransferase
ALAT	(IU/L)	Alanine aminotransferase
ALP	(IU/L)	Alkaline phosphatase
LDH	(IU/L)	Lactate dehydrogenase
CPK	(IU/L)	Creatine phosphokinase
T.Bil.	(mg/dL)	Total bilirubin
T.Prot.	(g/dL)	Total protein
Albumin	(g/dL)	Albumin
T.Chol.	(mg/dL)	Total cholesterol
TGL	(mg/dL)	Triglyceride
Glucose	(mg/dL)	Glucose
BUN	(mg/dL)	Blood urea nitrogen
Creat.	(mg/dL)	Creatinine
IP	(mg/dL)	Inorganic phosphorus
Ca	(mg/dL)	Calcium
Na	(mEq/L)	Sodium
K	(mEq/L)	Potassium
Cl	(mEq/L)	Chloride
TBA	( $\mu$ mol/L)	Total bile acid

Protein fraction

Albumin	(%)	Albumin
A1-glob.	(%)	Alpha-1 globulin
A2-glob.	(%)	Alpha-2 globulin
B-glob.	(%)	Beta globulin
G-glob.	(%)	Gamma globulin
A/G		Albumin / Globulin

Table 6-1 Blood chemistry in males (End of drug administration)

Study No. : SBL75-31

Dose(mg/kg)	Control	2.5	25	250.
N	5	5	5	5
ASAT (IU/L)	115.6+23.0	92.4+17.7	135.8+28.1	120.8+23.1
ALAT (IU/L)	38.8±3.7	39.2±2.9	58.2±25.5*	48.8±7.5
ALP (IU/L)	539.0±57.3	475.6±77.7	616.8±177.8	942.6±149.6**
LDH (IU/L)	2106.6±753.8	1235.8±824.0	2751.8±1313.4	2255.6±792.4
CPK (IU/L)	836.6±225.3	441.8±232.4	826.8±314.2	694.0±248.4
T.Bil. (mg/dL)	0.052±0.008	0.048±0.016	0.046±0.013	0.024±0.009**
T.Prot. (g/dL)	5.60±0.10	6.04±0.27	6.26±0.41**	5.92±0.34
Albumin (g/dL)	4.10±0.10	4.54±0.25	5.18±0.43**	5.00±0.24**
T.Chol. (mg/dL)	68.0±6.9	58.4±12.8	64.0±7.3	61.2±16.5
TGL (mg/dL)	51.0±16.0	36.2±10.1	45.0±14.8	57.2±11.5
Glucose (mg/dL)	186.2±14.0	173.2±14.3	190.4±14.6	198.2±27.1
BUN (mg/dL)	20.74±1.17	19.68±2.59	21.78±1.85	21.34±3.76
Creat. (mg/dL)	0.312±0.053	0.274±0.022	0.226±0.037**	0.248±0.022*
IP (mg/dL)	7.106±0.352	7.004±0.515	7.848±0.606	7.490±0.692
Ca (mg/dL)	8.94±0.26	9.28±0.16	9.58±0.20**	9.18±0.24
Na (mEq/L)	141.0±0.7	142.4±0.5	142.2±1.6	140.2±0.4
K (mEq/L)	4.46±0.17	4.40±0.41	4.54±0.27	4.62±0.18
Cl (mEq/L)	103.0±1.4	104.6±1.7	103.6±0.9	102.8±0.8
Albumin (%)	51.48±2.34	53.26±1.80	58.56±2.53**	61.00±1.66**
A1-glob. (%)	20.38±2.69	20.66±2.51	19.14±2.91	18.14±1.16
A2-glob. (%)	9.44±0.51	9.00±0.33	7.76±0.21**	7.60±0.37**
B-glob. (%)	14.52±0.92	12.88±1.02**	10.56±0.56**	9.02±0.30**
G-glob. (%)	4.18±1.03	4.20±0.31	3.98±0.76	4.24±0.80
A/G	1.058±0.098	1.142±0.086	1.418±0.141**	1.568±0.106**
TBA (μ. mol/L)	15.02±7.33	13.16±4.54	24.98±8.23	40.06±44.09

Values are expressed as the mean + S.D.

\* P&lt;0.05, \*\* P&lt;0.01 : Significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.

Table 6-2 Blood chemistry in females (End of drug administration)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
N	5	5	5	5
ASAT (IU/L)	130.2±11.3	112.8±37.2	106.4±14.8	103.8±22.6
ALAT (IU/L)	59.0±9.1	42.8±7.8	49.4±9.9	60.2±15.3
ALP (IU/L)	214.8±29.4	185.4±70.5	184.4±56.4	193.8±59.4
LDH (IU/L)	2642.2±802.9	2198.2±1795.1	1632.2±600.4	1347.4±653.2
CPK (IU/L)	794.4±425.0	588.4±457.5	445.6±137.3	333.0±156.2
T.Bil. (mg/dL)	0.058±0.016	0.074±0.030	0.044±0.011	0.056±0.013
T.Prot. (g/dL)	5.74±0.31	5.60±0.27	5.54±0.36	5.50±0.22
Albumin (g/dL)	4.46±0.29	4.36±0.15	4.38±0.31	4.30±0.19
T.Chol. (mg/dL)	79.6±16.8	58.4±3.2*	57.6±13.3*	64.2±12.9
TGL (mg/dL)	25.4±6.9	23.0±15.0	21.2±15.1	17.8±13.8
Glucose (mg/dL)	109.0±15.8	108.6±13.2	119.8±6.7	115.0±24.1
BUN (mg/dL)	26.14±8.24	17.28±5.27	19.82±4.06	18.90±4.97
Creat. (mg/dL)	0.308±0.044	0.290±0.040	0.330±0.029	0.282±0.028
IP (mg/dL)	6.614±0.971	5.620±0.963	6.274±0.867	6.020±0.726
Ca (mg/dL)	8.94±0.67	8.88±0.47	9.02±0.24	9.16±0.54
Na (mEq/L)	140.2±0.8	139.6±1.1	140.2±1.1	139.8±1.9
K (mEq/L)	4.10±0.16	4.22±0.16	4.00±0.14	3.92±0.19
Cl (mEq/L)	101.2±2.4	100.4±1.5	101.4±2.5	101.0±1.6
Albumin (%)	55.02±1.84	54.22±2.05	55.48±0.75	55.44±1.82
A1-glob. (%)	17.82±2.14	19.20±1.42	17.78±2.24	17.56±1.30
A2-glob. (%)	8.76±1.21	8.84±0.90	7.92±0.75	8.34±0.32
B-glob. (%)	13.46±0.92	13.34±0.90	13.68±0.76	13.38±0.99
G-glob. (%)	4.94±1.20	4.40±0.42	5.14±0.46	5.28±0.41
A/G	1.226±0.090	1.188±0.104	1.246±0.036	1.246±0.092
TBA (μ mol/L)	43.04±41.60	25.78±12.77	23.02±8.12	17.00±8.51

Values are expressed as the mean ± S.D.

\* p&lt;0.05 : Significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.

Table 6-3 Blood chemistry in males (End of recovery test)

Study No. : SBL75-31

Dose(mg/kg)	Control	2.5	25	250
N	5	0	0	5
ASAT (IU/L)	87.4±10.8			107.8±25.3
ALAT (IU/L)	34.0±4.4			74.2±35.0
ALP (IU/L)	316.8±65.4			343.0±38.7
LDH (IU/L)	756.8±223.1			838.4±309.5
CPK (IU/L)	384.6±98.9			353.8±127.5
T.Bil. (mg/dL)	0.054±0.023			0.040±0.012
T.Prot. (g/dL)	5.94±0.09			6.50±0.14**
Albumin (g/dL)	4.28±0.13			4.96±0.29**
T.Chol. (mg/dL)	55.4±16.8			96.6±30.3*
TGL (mg/dL)	20.0±5.3			37.0±27.0
Glucose (mg/dL)	194.4±22.7			183.4±16.1
BUN (mg/dL)	20.96±1.59			22.50±2.21
Creat. (mg/dL)	0.412±0.038			0.340±0.044*
IP (mg/dL)	7.568±0.159			7.552±0.674
Ca (mg/dL)	9.24±0.15			9.38±0.13
Na (mEq/L)	140.6±1.1			140.6±0.9
K (mEq/L)	4.36±0.19			4.50±0.48
Cl (mEq/L)	103.2±1.9			104.2±1.3
Albumin (%)	51.94±1.36			53.58±3.75
A1-glob. (%)	20.66±2.46			20.86±3.46
A2-glob. (%)	9.22±0.49			8.30±0.45*
B-glob. (%)	13.60±0.84			12.96±0.69
G-glob. (%)	4.58±0.89			4.30±0.60
A/G	1.084±0.058			1.168±0.174
TBA (μ mol/L)	15.44±8.92			21.42±19.90

Values are expressed as the mean + S.D.

\* P&lt;0.05 , \*\* P&lt;0.01 : Significantly different from the control group by t-test / Wilcoxon test.

Table 6-4 Blood chemistry in females (End of recovery test)

Study No. : SBL75-31

Dose(mg/kg)	Control	2.5	25	250
N	5	0	0	5
ASAT (IU/L)	84.4±9.2			74.8±14.3
ALAT (IU/L)	24.4±6.1			21.8±4.0
ALP (IU/L)	167.4±29.2			188.6±38.3
LDH (IU/L)	1178.2±667.1			967.8±514.9
CPK (IU/L)	342.6±174.9			303.0±109.5
T.Bil. (mg/dL)	0.062±0.004			0.084±0.026
T.Prot. (g/dL)	6.18±0.33			6.42±0.30
Albumin (g/dL)	4.98±0.20			5.26±0.30
T.Chol. (mg/dL)	69.2±4.1			60.2±8.1
TGL (mg/dL)	17.2±4.2			19.2±6.5
Glucose (mg/dL)	162.6±9.9			161.0±13.0
BUN (mg/dL)	21.70±2.61			21.20±4.48
Creat. (mg/dL)	0.382±0.034			0.366±0.025
IP (mg/dL)	4.682±0.515			4.638±1.243
Ca (mg/dL)	9.12±0.29			9.26±0.23
Na (mEq/L)	140.6±0.9			140.4±1.1
K (mEq/L)	3.92±0.24			3.92±0.22
Cl (mEq/L)	105.6±1.1			106.6±1.1
Albumin (%)	59.66±2.81			59.06±0.26
A1-glob. (%)	13.06±2.91			14.82±0.94
A2-glob. (%)	7.36±0.59			7.50±1.05
B-glob. (%)	13.80±1.00			13.68±0.88
G-glob. (%)	6.12±1.26			4.94±0.54
A/G	1.488±0.175			1.438±0.013
TBA (μ mol/L)	14.86±12.28			25.18±17.85

Values are expressed as the mean ± S.D.  
 Not significantly different from the control group by t-test / Wilcoxon test.



Table 7-1 Gross pathological findings in males (End of drug administration)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
No. of animals	10	10	10	10
Normal	10	10	10	9
Lung: Red focus	0	0	0	1

73

Table 7-2 Gross pathological findings in females (End of drug administration)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
No. of animals	10	10	10	10
No. of dams	9	10	10	10
Normal	9	10	10	10
No. of non-copulated animal	1	0	0	0
Normal	1	0	0	0

Table 7-3 Gross pathological findings in males (End of recovery test)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	250
No. of animals	5	5
Normal	4	5
Lung : Red focus	1	0

75

Table 7-4 Gross pathological findings in females (End of recovery test)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	250
No. of animals	5	5
Normal	5	5

Table 8 Abbreviations of organ weights

Study No. SBL75-31

Organ weight

Epididy. Sem. Vesic.	Epididymis Seminal vesicle
-R	(Right)
-L	(Left)
-R&L	(Right and Left)

77

Table 8-1

Organ weight in males (End of drug administration)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)		Control	2.5	25	250
	N	5	5	5	5
Adrenal-R	(mg)	29.46±6.49	28.76±4.44	29.54±2.67	24.92±2.33
Adrenal-L	(mg)	31.74±3.86	33.34±5.37	31.94±4.54	25.84±1.62
Adrenal-R&L	(mg)	61.20±9.48	62.10±9.20	61.48±6.92	50.76±3.21
Testis-R	(mg)	1613.6±63.3	1685.0±64.1	1501.4±132.3	1494.4±108.4
Testis-L	(mg)	1615.6±82.5	1700.6±112.8	1512.8±150.9	1504.0±146.5
Testis-R&L	(mg)	3229.2±141.5	3385.6±174.1	3014.2±281.9	2998.4±253.2
Thymus	(mg)	391.2±90.3	401.2±104.4	411.8±173.7	396.2±87.6
Spleen	(mg)	852.8±81.9	957.4±204.7	908.0±218.0	790.0±61.5
Brain	(mg)	2069.4±70.2	2093.0±63.3	2061.4±109.4	2001.2±88.0
Heart	(mg)	1413.4±69.9	1524.8±108.5	1440.2±156.4	1418.8±108.1
Liver	(g)	14.812±1.426	16.456±1.701	20.110±3.759*	24.110±2.602**
Kidney-R	(mg)	1572.6±92.6	1765.2±166.8	1761.0±195.5	1643.6±116.9
Kidney-L	(mg)	1595.6±161.4	1725.4±145.2	1739.0±206.0	1691.4±69.1
Kidney-R&L	(mg)	3168.2±248.7	3490.6±308.6	3500.0±398.5	3335.0±182.2
Epididy.-R	(mg)	620.8±23.6	635.4±36.1	596.0±54.2	613.8±63.4
Epididy.-L	(mg)	640.6±43.9	633.0±31.8	636.4±84.2	627.6±73.0
Epididy.-R&L	(mg)	1261.4±65.7	1268.4±58.7	1232.4±137.8	1241.4±134.0
Sem. Vesic.	(mg)	1712.4±178.5	1686.4±140.3	1704.4±210.8	1599.8±115.5
Prostate	(mg)	1365.8±92.7	1250.0±96.6	1415.8±339.7	1394.4±191.4

Values are expressed as the mean + S.D.

\* P&lt;0.05 , \*\* P&lt;0.01 : Significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.

Table 8-2

Organ weight in females (End of drug administration)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)		Control	2.5	25	250
N		5	5	5	5
Adrenal-R	(mg)	45.28±6.52	41.40±4.69	41.42±4.94	42.72±1.73
Adrenal-L	(mg)	50.44±9.02	43.64±6.14	43.84±5.39	46.74±2.61
Adrenal-R&L	(mg)	95.72±15.21	85.04±10.30	85.26±10.30	89.46±3.98
Ovary-R	(mg)	50.30±7.29	47.90±4.66	49.22±11.74	53.64±6.91
Ovary-L	(mg)	45.60±6.62	48.46±5.16	46.38±0.89	51.24±17.35
Ovary-R&L	(mg)	95.90±10.44	96.36±6.23	95.60±11.60	104.88±18.78
Thymus	(mg)	219.0±40.2	272.2±59.8	247.2±87.2	252.8±64.2
Spleen	(mg)	715.8±177.7	713.0±125.0	665.6±172.1	748.8±61.7
Brain	(mg)	1962.2±38.4	1963.0±61.0	1967.2±90.9	1939.6±61.2
Heart	(mg)	1059.6±142.1	1003.0±35.6	984.0±76.3	1011.0±98.0
Liver	(g)	9.892±1.644	8.992±0.665	9.158±0.692	9.686±0.542
Kidney-R	(mg)	1082.0±141.9	1040.4±69.2	984.8±106.5	1025.2±25.1
Kidney-L	(mg)	1082.0±138.8	1029.4±74.0	991.6±108.1	1008.2±19.9
Kidney-R&L	(mg)	2164.0±279.6	2069.8±140.5	1976.4±213.1	2033.4±28.6

Values are expressed as the mean ± S.D.

Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.

Table 8-3 Organ weight in males (End of recovery test)

Study No. : SBL75-31

Dose(mg/kg)		Control	2.5	25	250
N		5	0	0	5
Adrenal-R (mg)		30.28±4.07			32.00±4.41
Adrenal-L (mg)		29.96±4.22			33.10±6.34
Adrenal-R&L (mg)		60.24±8.16			65.10±10.65
Testis-R (mg)		1497.8±362.4			1434.4±375.4
Testis-L (mg)		1480.0±341.0			1416.6±370.9
Testis-R&L (mg)		2977.8±700.1			2851.0±744.8
Thymus (mg)		370.6±70.6			333.8±49.2
Spleen (mg)		833.8±85.2			868.2±151.5
Brain (mg)		2104.8±32.3			2161.0±61.7
Heart (mg)		1471.2±77.7			1584.6±46.7*
Liver (g)		13.318±1.013			15.678±1.709*
Kidney-R (mg)		1643.0±131.0			1663.8±171.6
Kidney-L (mg)		1620.0±101.4			1706.4±207.6
Kidney-R&L (mg)		3263.0±225.1			3390.2±377.3
Epididy.-R (mg)		647.6±121.0			621.2±82.9
Epididy.-L (mg)		628.8±116.3			597.8±79.4
Epididy.-R&L (mg)		1276.4±235.5			1219.0±161.6
Sem. Vesic. (mg)		1650.0±231.7			1629.6±377.5
Prostate (mg)		1304.4±173.4			1219.6±257.2

Values are expressed as the mean ± S.D.

\* P&lt;0.05 : Significantly different from the control group by t-test / Wilcoxon test.



Table 8-4 Organ weight in females (End of recovery test)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)		Control	2.5	25	250
N		5	0	0	5
Adrenal-R	(mg)	32.40±1.24			35.26±7.28
Adrenal-L	(mg)	34.46±1.62			36.46±6.40
Adrenal-R&L	(mg)	66.86±2.13			71.72±13.67
Ovary-R	(mg)	42.58±4.16			45.66±5.97
Ovary-L	(mg)	41.18±6.73			47.36±16.14
Ovary-R&L	(mg)	83.76±8.16			93.02±19.94
Thymus	(mg)	323.0±55.0			508.6±384.1
Spleen	(mg)	489.6±47.5			511.6±89.6
Brain	(mg)	1934.6±111.8			1894.8±86.8
Heart	(mg)	906.6±99.7			928.8±85.5
Liver	(g)	7.096±0.549			7.544±0.500
Kidney-R	(mg)	944.2±78.3			941.0±26.4
Kidney-L	(mg)	931.6±83.0			924.6±15.9
Kidney-R&L	(mg)	1875.8±153.6			1865.6±26.0

Values are expressed as the mean ± S.D.

Not significantly different from the control group by t-test / Wilcoxon test.

Table 8-5

Relative organ weight in males (End of drug administration)

Study No. : SBL75-31

Dose(mg/kg) N	Control 5	2.5 5	25 5	250 5
Body weight (g)	450.8±34.6	463.4±26.2	454.4±36.7	437.0±10.9
Adrenal-R (mg/100gBW)	6.60±1.56	6.22±0.98	6.56±1.05	5.70±0.46
Adrenal-L (mg/100gBW)	7.08±0.87	7.20±1.21	7.08±1.25	5.90±0.34
Adrenal-R&L (mg/100gBW)	13.64±2.29	13.42±2.06	13.62±2.20	11.60±0.62
Testis-R (mg/100gBW)	359.8±30.0	364.4±21.2	331.6±33.0	341.8±24.9
Testis-L (mg/100gBW)	360.2±32.8	368.0±30.9	334.4±39.8	344.0±33.7
Testis-R&L (mg/100gBW)	719.8±62.3	732.2±51.3	666.0±72.7	686.2±58.2
Thymus (mg/100gBW)	87.4±22.7	86.2±18.6	89.4±31.5	90.8±20.5
Spleen (mg/100gBW)	189.8±19.4	206.0±37.6	198.8±35.3	181.2±17.3
Brain (mg/100gBW)	461.0±34.3	453.0±34.0	457.4±61.2	458.6±30.0
Heart (mg/100gBW)	314.2±11.1	329.4±18.4	316.6±18.2	324.8±23.8
Liver (g/100gBW)	3.284±0.127	3.544±0.198	4.408±0.548*	5.524±0.658**
Kidney-R (mg/100gBW)	350.8±39.4	380.8±24.8	387.2±22.4	376.2±27.9
Kidney-L (mg/100gBW)	355.6±44.2	372.8±27.0	382.4±23.5	387.6±18.7
Kidney-R&L (mg/100gBW)	706.4±81.9	753.2±50.6	769.4±44.6	763.4±45.2
Epididym.-R (mg/100gBW)	138.4±12.3	137.0±4.5	131.4±7.5	140.0±12.6
Epididym.-L (mg/100gBW)	142.8±14.7	136.6±7.9	139.8±11.3	143.6±15.7
Epididym.-R&L (mg/100gBW)	281.2±26.5	274.2±10.4	271.2±17.9	284.0±28.0
Sem. Vesic. (mg/100gBW)	382.6±60.3	365.2±40.4	375.6±40.3	366.2±26.8
Prostate (mg/100gBW)	304.6±35.2	270.4±24.5	309.2±57.1	318.6±38.1

Values are expressed as the mean + S.D.

\* P&lt;0.05 , \*\* P&lt;0.01 : Significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.

Table 8-6

Relative organ weight in females (End of drug administration)

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg) N	Control 5	2.5 5	25 5	250 5
Body weight (g)	281.6±32.8	290.4±13.6	276.0±14.5	283.0±20.9
Adrenal-R (mg/100gBW)	16.20±2.75	14.28±1.66	15.02±1.60	15.14±0.76
Adrenal-L (mg/100gBW)	17.96±2.71	15.04±2.10	15.88±1.72	16.56±1.02
Adrenal-R&L (mg/100gBW)	34.14±5.23	29.34±3.59	30.90±3.31	31.70±1.60
Ovary-R (mg/100gBW)	18.10±3.61	16.54±2.06	17.84±4.11	18.96±1.85
Ovary-L (mg/100gBW)	16.42±3.19	16.66±1.07	16.84±0.71	17.96±5.11
Ovary-R&L (mg/100gBW)	34.54±5.90	33.20±1.89	34.68±4.16	36.94±4.45
Thymus (mg/100gBW)	77.6±7.8	93.6±18.6	90.2±32.9	90.2±26.5
Spleen (mg/100gBW)	252.0±44.0	246.0±46.5	239.8±51.6	264.6±15.5
Brain (mg/100gBW)	705.6±97.9	677.2±43.8	715.6±67.6	688.4±57.5
Heart (mg/100gBW)	376.2±18.5	345.6±11.9	356.6±21.7	358.0±35.1
Liver (g/100gBW)	3.506±0.365	3.098±0.185*	3.318±0.099	3.432±0.203
Kidney-R (mg/100gBW)	385.0±30.7	358.0±13.3	356.4±27.6	363.8±27.8
Kidney-L (mg/100gBW)	385.2±37.0	354.4±20.4	359.0±30.4	357.8±22.4
Kidney-R&L (mg/100gBW)	770.2±67.4	712.8±32.5	715.2±57.2	721.4±48.8

Values are expressed as the mean + S.D.

\* P&lt;0.05 : Significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test.

Table 8-7 Relative organ weight in males (End of recovery test)

Study No. : SBL75-31

Dose(mg/kg)	Control	2.5	25	250
N	5	0	0	5
Body weight (g)	474.2±22.8			457.0±25.2
Adrenal-R (mg/100gBW)	6.38±0.75			7.00±0.96
Adrenal-L (mg/100gBW)	6.30±0.81			7.26±1.37
Adrenal-R&L (mg/100gBW)	12.70±1.52			14.24±2.37
Testis-R (mg/100gBW)	317.6±82.5			311.8±70.5
Testis-L (mg/100gBW)	313.8±78.6			307.8±70.0
Testis-R&L (mg/100gBW)	631.4±160.4			619.2±140.6
Thymus (mg/100gBW)	79.0±18.3			73.2±11.9
Spleen (mg/100gBW)	176.2±20.8			189.8±29.8
Brain (mg/100gBW)	444.4±18.2			473.8±22.4
Heart (mg/100gBW)	310.0±1.9			347.2±9.3**
Liver (g/100gBW)	2.810±0.188			3.434±0.360**
Kidney-R (mg/100gBW)	346.8±27.1			368.0±26.7
Kidney-L (mg/100gBW)	342.0±24.0			373.0±32.9
Kidney-R&L (mg/100gBW)	689.0±49.5			741.0±58.7
Epididym.-R (mg/100gBW)	137.0±28.3			135.8±16.0
Epididym.-L (mg/100gBW)	133.0±26.3			130.8±14.6
Epididym.-R&L (mg/100gBW)	270.2±54.2			266.6±30.9
Sem. Vesic. (mg/100gBW)	348.0±43.8			357.6±89.0
Prostate (mg/100gBW)	275.6±40.9			267.6±62.3

Values are expressed as the mean + S.D.

\* P&lt;0.01 : Significantly different from the control group by t-test / Wilcoxon test.

Table 8-8

Relative organ weight in females (End of recovery test)

Study No. : SBL75-31

Dose(mg/kg)	Control	2.5	25	250
N	5	0	0	5
Body weight (g)	268.2±21.4			283.0±17.5
Adrenal-R (mg/100gBW)	12.12±0.90			12.46±2.47
Adrenal-L (mg/100gBW)	12.94±1.17			12.90±2.18
Adrenal-R&L (mg/100gBW)	25.04±1.99			25.36±4.64
Ovary-R (mg/100gBW)	15.98±2.33			16.22±2.50
Ovary-L (mg/100gBW)	15.32±1.93			16.88±6.32
Ovary-R&L (mg/100gBW)	31.32±3.15			33.12±8.11
Thymus (mg/100gBW)	120.0±12.3			174.2±115.9
Spleen (mg/100gBW)	183.6±22.6			180.8±30.5
Brain (mg/100gBW)	724.2±57.3			670.2±25.4
Heart (mg/100gBW)	338.0±21.6			328.4±30.9
Liver (g/100gBW)	2.652±0.184			2.664±0.107
Kidney-R (mg/100gBW)	354.2±44.9			333.0±12.9
Kidney-L (mg/100gBW)	349.0±39.4			327.8±22.4
Kidney-R&L (mg/100gBW)	703.2±82.6			660.8±34.6

Values are expressed as the mean + S.D.

Not significantly different from the control group by t-test / Wilcoxon test.

Table 9-1 Histopathological findings in males [H.E. staining] (End of drug administration)

Study No.: SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	250
No. of animals	5	5
Normal	0	0
Adrenal (Left)		
Vacuolation, zona fasciculata cell	2	2
Adrenal (Right)		
Vacuolation, zona fasciculata cell	2	2
Heart		
Fibrosis, myocardium, left ventricle	1	1
Mononuclear cell infiltration, myocardium, left ventricle	0	2
Mononuclear cell infiltration, myocardium, right ventricle	1	0
Kidney (Left)		
Basophilia, tubule	3	3
Hyaline cast, tubular lumen	1	0
Mineralization, cortex	1	0
Mononuclear cell infiltration, cortex	1	0
Vacuolation, tubular epithelium	1	0

Table 9-1 (Continued)

Study No.: SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	250
No. of animals	5	5
Kidney (Right)		
Basophilia, tubule	1	2
Mononuclear cell infiltration, cortex	1	0
Lung (Including bronchus, left)		
Foam cell accumulation, alveolus	2	1
Osseous metaplasia	1	0
Lung (Including bronchus, right)		
Foam cell accumulation, alveolus	1	2
Mineralization, arterial wall	2	0
Mononuclear cell infiltration, alveolus	1	0
Lung (Gross abnormal site, right)		
Inflammatory cell infiltration, alveolus, focal	0	1

87

Table 9-2 Histopathological findings in females [H.E. staining] (End of drug administration)

Study No.: SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	250
No. of animals	5	5
Normal	1	0
Kindney (Left)		
Basophilia, tubule	3	0
Mineralization, cortico-medullary junction	0	1
Mononuclear cell infiltration, cortex	1	0
Kindney (Right)		
Eosinophil infiltration, transitional epithelium, pelvis	1	0
Foreign material, pelvic lumen	1	0
Mineralization, cortico-medullary junction	0	1
Mononuclear cell infiltration, cortex	1	0



Table 9-2 (Continued)

Study No.: SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	250
No. of animals	5	5
Lung (Including bronchus, left)		
Foam cell accumulation, alveolus	1	1
Inflammatory cell infiltration, perivasular	1	0
Proliferation, alveolar epithelium	1	0
Lung (Including bronchus, right)		
Foam cell accumulation, alveolus	1	2
Granuloma	1	0
Mineralization, arterial wall	0	3
Lymph node (Mesenteric)		
Increase, dendritic cell-like cell	0	1
Trachea		
Squamous metaplasia, ciliated epithelium	1	0

Table 9-3 Histopathological findings in males [Testis, PAS-Hematoxylin staining] (End of drug administration)

Study No.: SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	250
No. of animals	5	5
Normal	5	5

Table 9-4 Histopathological findings in animals [Liver, H.E. staining] (End of drug administration) Study No.: SBL75-31

Male

Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
No. of animals	5	5	5	5
Liver				
Normal	1	3	3	3
Bile duct proliferation, focal	0	0	0	1
Mononuclear cell infiltration	2	2	2	1
Vacuolation, hepatocyte	2	0	0	0

Female

Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
No. of animals	5	5	5	5
Liver				
Normal	3	3	3	5
Mononuclear cell infiltration	1	1	2	0
Vacuolation, hepatocyte	1	1	0	0

Table 10-1 Clinical signs in pups (F1) - Lactation period

Study No. : SBL75-31

Group	Control	2.5	25	250
Dose (mg/kg)				
No. of dams	9	10	10	10
No. of live pups at birth	126	139	128	139
No. of live pups at day 4	126	137	125	136
<b>Clinical signs</b>				
No. of pups(No. of dams)				
Normal	126 (9)	139 (10)	128 (10)	139 (10)
Death(No. of dams with total litter loss)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Table 10-2 External findings at birth (F1)

Study No. : SBL75-31

Group Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
No. of dams	9	10	10	10
No. of pups	126	139	128	139
External findings in pups				
Malformations (%)	0.00 ± 0.00 [0]	0.00 ± 0.00 [0]	0.00 ± 0.00 [0]	0.00 ± 0.00 [0]

(%) : Litter - basis analysis  
 [ ]:No. of pups with malformations  
 Not significantly different from control.

Table 11 Development of pups (F1) up to Day 4 after birth

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
Pregnant animal	9	10	10	10
Duration of gestation (day)	21.89 ± 0.42	21.94 ± 0.30	21.95 ± 0.37	22.00 ± 0.24
Delivery animal	9	10	10	10
Gestation index (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
No. of corpora lutea	16.1 ± 1.9	15.7 ± 1.8	15.3 ± 1.5	16.0 ± 1.9
No. of implantations	15.3 ± 1.7	14.8 ± 1.5	14.1 ± 1.2	14.2 ± 3.2
Implantation index (%) a)	95.36 ± 5.02	94.91 ± 10.81	92.54 ± 6.97	90.72 ± 16.91
At birth				
No. of born	14.1 ± 2.2	14.0 ± 1.9	12.8 ± 2.0	14.0 ± 3.1
No. of live	14.0 ± 2.2	13.9 ± 1.9	12.8 ± 2.0	13.9 ± 2.9
Live birth index (%) b)	91.07 ± 7.23	93.80 ± 7.00	91.01 ± 13.84	96.45 ± 5.69
Viability index (%) c)	99.21 ± 2.37	99.29 ± 2.25	98.82 ± 3.73	98.80 ± 2.55
Sex ratio (Female/Total)	0.53 ± 0.09	0.50 ± 0.15	0.53 ± 0.09	0.61 ± 0.16
At 4 days				
No. of live	14.0 ± 2.2	13.7 ± 1.6	12.5 ± 2.1	13.6 ± 3.0
Viability index (%) d)	100.00 ± 0.00	98.79 ± 2.55	97.55 ± 3.96	97.73 ± 3.67
Sex ratio (Female/Total)	0.53 ± 0.09	0.49 ± 0.14	0.54 ± 0.10	0.61 ± 0.15

a) Implantation index : (No. of implantations / No. of corpora lutea) × 100

b) Live birth index : (No. of live at birth / No. of implantations) × 100

c) Viability index Day 0 : (No. of live at birth / No. of born at birth) × 100

d) Viability index Day 4 : (No. of live at 4 days / No. of live at birth) × 100

Not significantly different from the control group by Dunnet's test / Dunnet's type test.

Not significantly different from the control group by Fisher's exact test.

Table 12

Body weight of pups (F1) - Lactation period ( mean  $\pm$  S.D. , g )

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
No. of dams	9	10	10	10
Postnatal day				
0 : Male	6.5 $\pm$ 0.5 (58)	6.5 $\pm$ 0.5 (70)	6.8 $\pm$ 0.3 (60)	6.5 $\pm$ 0.4 (58)
Female	6.0 $\pm$ 0.4 (58)	6.2 $\pm$ 0.5 (69)	6.3 $\pm$ 0.4 (68)	6.1 $\pm$ 0.4 (81)
4 : Male	9.3 $\pm$ 1.1 (58)	9.4 $\pm$ 0.9 (70)	10.2 $\pm$ 0.7 (58)	9.6 $\pm$ 1.4 (56)
Female	8.9 $\pm$ 1.0 (58)	9.0 $\pm$ 0.8 (67)	9.7 $\pm$ 0.7 (67)	9.1 $\pm$ 1.5 (80)

( ) : No. of pups (F1)

Not significantly different from the control group by Dunnet's type test / Dunnet's test

Table 13 Gross pathological findings in pups (F1) at Day 4 after birth

Study No. : SBL75-31

Dose (mg/kg)	Control	2.5	25	250
No. of dams (F0)	9	10	10	10
No. of pups (F1)	126	137	125	136
External findings				
Malformations				
Mean frequencies (%)	0.00 ± 0.00 [0]	0.00 ± 0.00 [0]	0.00 ± 0.00 [0]	0.00 ± 0.00 [0]
Visceral findings				
Malformations				
Mean frequencies (%)	0.00 ± 0.00 [0]	0.00 ± 0.00 [0]	0.00 ± 0.00 [0]	0.00 ± 0.00 [0]

(\*) : Litter - basis analysis

[ ]:No. of pups with malformations

Not significantly different from control.



18-1. 2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノールの ReproTox 試験

8. 要約

8.1 成績概要表 1

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール (DBHCB) のラットにおける強制経口投与による 28 日間反復投与毒性/生殖発生毒性併合試験

試験系		ラット, 雄: 5 週齢			
被験物質		対照 <sup>a)</sup>	DBHCB		
投与量 (mg/kg/日)		0	2.5	25	250
投与液量 (mL/kg/日)		10	10	10	10
濃度 (mg/mL)		0	0.25	2.5	25
動物数 (毒性群, 休薬群)		10, 5	10	10	10, 5
死亡数		0	0	0	0
一般状態	投与期間	-	-	-	-
	休薬期間	-	/	/	-
体重	投与期間	-	-	-	-
	休薬期間	-	/	/	-
摂餌量	投与期間	-	17-18 日↓	-	28-29 日↓
	休薬期間	-	/	/	-
剖検	投与期間終了時	-	-	-	肺:赤色巣(1)
	休薬期間終了時	肺:赤色巣(1)	/	/	-
器官重量	投与期間終了時	-	-	肝臓(絶, 相)↑	肝臓(絶, 相)↑
	休薬期間終了時	-	/	/	心臓(絶, 相)↑ 肝臓(絶, 相)↑
血液学的検査	投与期間終了時	-	-	活性化部分トロンボプラスチン時間↓	活性化部分トロンボプラスチン時間↓ 好中球数↑ 赤血球数↓
	休薬期間終了時	-	/	/	好中球数↑ 好中球(%)↑ リンパ球(%)↓ 血小板数↑

-: 対照群との間に有意な差なし, あるいは異常所見なし.

↑: 統計学的に有意な高値, ↓: 統計学的に有意な低値.

a: 5 w/v%アラビアゴム水溶液,

絶: 絶対重量, 相: 相対重量.

## 成績概要表 (続き)

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル) -5-クロロベンゾトリアゾール (DBHCB) のラットにおける強制経口投与による 28 日間反復投与毒性/生殖発生毒性併合試験

試験系		ラット, 雄: 5 週齢			
被験物質		対照 <sup>a)</sup>	DBHCB		
投与量 (mg/kg/日)		0	2.5	25	250
動物数 (毒性群, 休業群)		10, 5	10	10	10, 5
血液生化学的検査	投与期間 終了時			アルブミン↑ アルブミン比率↑ A/G 比↑ クレアチニン↓ α <sub>2</sub> -グロブリン比率↓ β-グロブリン比率↓ ALAT↑ 総蛋白↑ Ca↑	アルブミン↑ アルブミン比率↑ A/G 比↑ クレアチニン↓ α <sub>2</sub> -グロブリン比率↓ β-グロブリン比率↓ ALP↑ 総ビリルビン↓
	休業期間 終了時				アルブミン↑ クレアチニン↓ α <sub>2</sub> -グロブリン比率↓ 総蛋白↑ 総コレステロール↑

-: 対照群との間に有意な差なし, あるいは異常所見なし.

↑: 統計学的に有意な高値, ↓: 統計学的に有意な低値.

a: 5 w/v%アラビアゴム水溶液.

## 成績概要表 (続き)

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル) -5-クロロベンゾトリアゾール (DBHCB) のラットにおける強制経口投与による 28 日間反復投与毒性/生殖発生毒性併合試験

試験系		ラット, 雄: 5 週齢				
被験物質		対照 <sup>a)</sup>	DBHCB			
投与量 (mg/kg/日)		0	2.5	25	250	
動物数 (毒性群)		5	5	5	5	
病理組織学的検査 <sup>b)</sup>	投与期間終了時 <sup>b)</sup>	副腎	束状帯細胞の空胞化			
			左:2/5, 右:2/5			左:2/5, 右:2/5
		心臓	心室心筋の繊維化			
			左:1/5			左:1/5
			心室心筋の単核細胞浸潤			
			右:1/5			左:2/5
		腎臓 <sup>c)</sup>	尿細管の好塩基性変化			
			左:3/5, 右:1/5			左:3/5, 右:2/5
		肺 <sup>d)</sup>	肺胞の泡沫細胞蓄積			
			左:2/5, 右:1/5			左:1/5, 右:2/5
			血管周囲の炎症細胞浸潤			
			-			右:1/5
		肝臓 <sup>e)</sup>	単核細胞浸潤			
			2/5	2/5	2/5	1/5
限局性胆管の増殖						
	-	-	-	1/5		

-: 対照群との間に有意な差なし, あるいは異常所見なし.

a: 5 w/v%アラビアゴム水溶液.

b: 投与期間終了時の病理組織学的検査で被験物質投与に起因する変化がみられなかったことから休業期間終了時の検査は実施しなかった.

c: 対照群のみに認められた変化は尿細管腔内に硝子円柱, 尿細管上皮の空胞化, 皮質の単核細胞浸潤, 皮質の鉍質沈着であった.

d: 対照群では骨化生, 動脈壁の鉍質沈着, 肺胞の単核細胞浸潤がみられた.

e: 対照群では空胞化がみられた.

## 成績概要表 (続き)

2- (3,5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル) -5-クロロベンゾトリアゾール (DBHCB) のラットにおける強制経口投与による 28 日間反復投与毒性/生殖発生毒性併合試験

試験系		ラット, 雌: 5 週齢			
被験物質		対照 <sup>a)</sup>	DBHCB		
投与量 (mg/kg/日)		0	2.5	25	250
動物数 (毒性群, 休業群)		10, 5	10	10	10, 5
死亡数		0	0	0	0
一般状態	投与期間	-	-	-	-
	休業期間	-	/	/	-
体重	投与期間	-	17-21 日増加量 ↑	-	-
	休業期間	-	/	/	-
摂餌量	投与期間	-	-	-	31-32 日 ↑
	休業期間	-	/	/	-
剖検	投与期間終了時	-	-	-	-
	休業期間終了時	-	/	/	-
器官重量	投与期間終了時	-	肝臓 (相) ↓	-	-
	休業期間終了時	-	/	/	-
血液学的検査	投与期間終了時	-	-	好酸球数 ↓	好酸球数 ↓
	休業期間終了時	-	/	/	-
血液生化学的検査	投与期間終了時	-	総コレステロール ↓	総コレステロール ↓	-
	休業期間終了時	-	/	/	-

- : 対照群との間に有意な差なし, あるいは異常所見なし.

↑ : 統計学的に有意な高値, ↓ : 統計学的に有意な低値.

a : 5 w/v% アラビアゴム水溶液,

相 : 相対重量.

## 成績概要表 (続き)

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル) -5-クロロベンゾトリアゾール (DBHCB) のラットにおける強制経口投与による 28 日間反復投与毒性/生殖発生毒性併合試験

試験系		ラット, 雌: 5 週齢				
被験物質		対照 <sup>a)</sup>	DBHCB			
投与量 (mg/kg/日)		0	2.5	25	250	
動物数 (毒性群)		5			5	
死亡数		0	0	0	0	
病理組織学的検査 <sup>b)</sup>	投与期間終了時 <sup>b)</sup>	腎臓 <sup>c)</sup>	皮質髄質境界部の鉍質沈着			
			-			左:1/5, 右:1/5
		肺 <sup>d)</sup>	肺胞の泡沫細胞蓄積			
			左:1/5, 右:1/5			左:1/5, 右:2/5
			動脈壁の鉍質沈着			
		-			右:3/5	
		気管	線毛上皮の扁平上皮化生			
			1/5			-
		腸間膜リンパ節	樹状細胞様細胞の増加			
			-			1/5
		肝臓	単核細胞浸潤			
			1/5	1/5	2/5	-
空胞化						
1/5	1/5	-	-			

- : 対照群との間に有意な差なし, あるいは異常所見なし.

a : 5 w/v%アラビアゴム水溶液.

b : 投与期間終了時の病理組織学的検査で被験物質投与に起因する変化がみられなかったことから休薬期間終了時の検査は実施しなかった.

c : 対照群では皮質の単核細胞浸潤, 尿細管の好塩基性変化, 腎盂腔内の異物, 腎盂移行上皮の好酸球浸潤がみられた.

d : 対照群では血管周囲の炎症細胞浸潤, 肺胞上皮の増殖, 肉芽種がみられた.

## 成績概要表 (続き)

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル) -5-クロロベンゾトリアゾール (DBHCB) のラットにおける強制経口投与による 28 日間反復投与毒性/生殖発生毒性併合試験

試験系		ラット, 雌:5 週齢				
被験物質		対照 <sup>a)</sup>	DBHCB			
投与量 (mg/kg/日)		0	2.5	25	250	
動物数		10	10	10	10	
交尾率		90.0	100.0	100.0	100.0	
交尾までの日数		4.9	3.4	2.7	2.8	
受胎率		100.0	100.0	100.0	100.0	
妊娠期間		21.89	21.94	21.95	22.00	
出産率		100.0	100.0	100.0	100.0	
黄体数		16.1	15.7	15.3	16.0	
着床数		15.3	14.8	14.1	14.2	
着床率		95.36	94.91	92.54	90.72	
出産児数		14.1	14.0	12.8	14.0	
出生率		91.07	93.80	91.01	96.45	
一般状態		-	-	-	-	
外形所見		-	-	-	-	
性比 (生後 0 日)		0.53	0.50	0.53	0.61	
生存率	生後 0 日	99.21	99.29	98.82	98.80	
	生後 4 日	100.00	98.79	97.55	97.73	
体重	生後 0 日	雄	6.5	6.5	6.8	6.5
		雌	6.0	6.2	6.3	6.1
	生後 4 日	雄	9.3	9.4	10.2	9.6
		雌	8.9	9.0	9.7	9.1
剖検		-	-	-	-	

- : 対照群との間に有意な差なし, あるいは異常所見なし.

a : 5 w/v%アラビアゴム水溶液.

## 8.2 要約

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール (DBHCB と略) の 0 (対照), 2.5, 25 及び 250 mg/kg/日を各群雌雄各 10 例の Crj:CD (SD) IGS ラットに 28 日間強制経口投与し, その後交配させて生殖能力を観察するとともに被験物質の反復投与毒性を調べ, さらに 2 週間の休業期間を設けて発現した毒性の回復性についても検討した. 対照群には 5 w/v%アラビアゴム水溶液を被験物質群と同様の方法で投与した.

### 親動物に対する影響

いずれの群においても死亡はなかった. 投与期間及び休業期間を通して一般状態, 体重及び摂餌量に被験物質投与の影響はみられなかった. 生殖能力については, 交尾率, 受 (授) 胎率, 交尾成立までの平均日数, 妊娠期間, 着床痕数及び出産率に, 被験物質投与の影響はみられなかった.

投与期間終了時の血液学的検査では, 雄の 25 mg/kg 群以上で活性化部分トロンボプラスチン時間が短縮した. その他に 250 mg/kg 群では赤血球数が減少し, 好中球数が有意に増加した. 休業期間終了時の血液学的検査では雄の 250 mg/kg 群で血小板数及び好中球数が増加した. 雌では, 投与期間終了時の血液学的検査で, 25 mg/kg 群以上で好酸球数が減少したが, 休業期間終了時の検査では, 被験物質投与の影響はみられなかった.

投与期間終了時の血液生化学的検査では, 雄の 25 mg/kg 群以上で, アルブミンが高値を示し, A/G 比が増加し,  $\alpha_2$ -グロブリン比率及び $\beta$ -グロブリン比率が減少した. その他にクレアチニンの低値がみられた. 250 mg/kg 群では ALP が増加し総ビリルビンが減少した. また, 雄ではすべての被験物質投与群の $\beta$ -グロブリン比率が減少した. 25 mg/kg 群では ALAT, 総蛋白及び Ca が増加した. 雌では 2.5 及び 25 mg/kg 群で総コレステロールが減少したが, 250 mg/kg 群ではいずれの測定項目においても被験物質投与の影響はみられなかった. 休業期間終了時の血液生化学的検査では雄の 250 mg/kg 群で総蛋白, アルブミン及び総コレステロールが高値を示し, クレアチニン及び $\alpha_2$ -グロブリン比率が減少した. アルブミンの高値及びクレアチニンの低値は投与期間終了時と同様であった. 雌では 250 mg/kg においても, いずれの測定項目にも被験物質投与の影響はみられなかった.

投与期間終了時及び休業期間終了時の剖検においては, 雄及び雌動物に被験物質投与に起因する変化は認められなかった.

投与期間終了時の器官重量では, 雄の肝臓重量 (絶対値及び相対値) が 25 mg/kg 群以上で増加した. 雌では被験物質投与の影響は認められなかった.

休業期間終了時の器官重量では, 雄の 250 mg/kg 群で肝臓重量 (絶対値及び相対値) 及び心臓重量 (絶対値及び相対値) が増加した. 雌では器官重量に被験物質投与の影響は認められなかった.

投与期間終了時の病理組織学的検査は相対及び絶対重量で器官重量が増加した肝臓を除き対照群と 250 mg/kg 群で実施した. 投与期間終了時の病理組織学的検査では, 250 mg/kg 群の雄で副腎に細胞の空胞化, 心臓に心室心筋の繊維化及び単核細胞浸潤がみられた. 腎臓では

尿細管の好塩基性変化, 肺では肺胞の泡沫細胞蓄積, 血管周囲の炎症性細胞浸潤がみられた。

雌で, 250 mg/kg 群で腎臓の皮質髄質境界部の鉍質沈着, 肺胞の泡沫細胞蓄積, 動脈壁の鉍質沈着, 気管の線毛上皮の扁平上皮化生, 腸間膜リンパ節の樹状細胞様細胞の増加が認められた。

雄の肝臓重量が増加したため雌雄の対照群及びすべての被験物質投与群で病理組織学的検査を実施した肝臓では, 雄で単核細胞浸潤が対照群, 2.5, 25 mg/kg 群及び 250 mg/kg 群で見られた。250 mg/kg 群では限局性胆管の増殖がみられた。雌では単核細胞浸潤が対照群及び被験物質投与群で見られた。その他に肝細胞の空胞化が対照群及び 2.5 mg/kg 群で見られた。

投与期間終了時の病理組織学的検査で認められた変化の程度はいずれも軽度なもので当社背景データにみられる変化であり, 発現頻度も対照群と 250 mg/kg 群との間に差はみられなかった。このように被験物質投与に起因する病理組織学的異常所見がみられなかったことからいずれの器官についても休薬期間終了時の病理組織学的検査は実施しなかった。

#### 出生児への影響

出産児数, 出生率, 性比及び生後 4 日生存率に被験物質投与の影響はみられなかった。いずれの群にも外形異常児はみられず, 一般状態, 体重及び生後 4 日の剖検で被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のように, 本試験条件下では, 雄の 25 mg/kg 群以上の血液生化学的検査でアルブミンの増加等, 血液学的検査で活性化部分トロンボプラスチン時間の低下等ならびに肝臓重量の増加がみられたことから, 一般毒性学的無毒性量は 2.5 mg/kg/日と判断した。

また, 交尾率, 妊娠率, 出産率及び出生児への影響が認められないことから生殖発生毒性学的無毒性量は 250 mg/kg/日と判断した。



## 10. 結果

### 10.1 親動物に対する影響

#### 10.1.1 一般状態 (Tables 1-1~1-4, 11, Appendices 1-1~1-7, 11-1~11-4)

いずれの群においても死亡はなかった。一般状態の観察では投与期間及び休薬期間を通して異常はみられなかった。

妊娠期間及び出産率には対照群と被験物質群の間に有意な差はみられなかった。

#### 10.1.2 体重 (Tables 2-1~2-8, Appendices 2-1~2-33)

投与期間及び休薬期間を通していずれの測定時においても、雌雄ともに対照群と被験物質群との間に体重及び体重増加量に有意な差はみられなかった。

#### 10.1.3 摂餌量 (Tables 3-1~3-4, Appendices 3-1~3-16)

雄では投与 28-29 日、雌では投与 31-32 日に 250 mg/kg 群で対照群と比べて摂餌量の低値あるいは高値がみられた。投与期間及び休薬期間を通してその他のいずれの測定時においても、雌雄とも対照群と被験物質群との間に有意な差はみられなかった。

#### 10.1.4 交配 (Table 4, Appendices 4-1~4-4)

交尾率、受（授）胎率及び交尾成立までの平均日数について、被験物質群と対照群との間に有意な差はみられなかった。

#### 10.1.5 剖検所見 (Tables 7-1~7-4, 11, Appendices 7-1~7-4, 11-1~11-4)

雄では投与期間終了時の剖検で 250 mg/kg 群の 1 例 (Animal No. 10032) で肺に赤色巣がみられた。休薬期間終了時の剖検では対照群の 1 例 (Animal No. 10042) で肺に赤色巣がみられた。2.5 及び 25 mg/kg 群で異常はみられなかった。赤色巣は新鮮な所見であることから、放血時に発生したと考えられ被験物質投与の影響ではないと判断した。

雌では投与期間終了時及び休薬期間終了時のいずれにおいても被験物質投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。未交尾の雌 (Animal No. 10506) の剖検においても異常はみられなかった。

着床痕数については、対照群と被験物質群との間に有意な差はみられなかった。

#### 10.1.6 血液学的検査 (Tables 5-1~5-4, Appendices 5-1~5-8)

投与期間終了時には雄の 25 及び 250 mg/kg 群で活性化部分トロンボプラスチン時間が有意に短縮した。また 250 mg/kg 群では対照群と比べて赤血球数が有意に減少し好中球数が有意に増加した。雌では 25 及び 250 mg/kg 群で対照群と比べて好酸球数が有意に減少した。

休薬期間終了時では雄の 250 mg/kg 群で対照群と比べて、血小板数及び好中球数が有意に増加した。雌では対照群と被験物質投与群との間には有意な差はみられなかった。

#### 10.1.7 血液生化学的検査 (Tables 6-1~6-4, Appendices 6-1~6-10)

投与期間終了時の雄ではすべての被験物質投与群で対照群と比べて $\beta$ -グロブリン比率が有意に減少した。25及び250 mg/kg群では対照群に比べてアルブミン及びA/G比が有意に増加し、クレアチニン及び $\alpha_2$ -グロブリン比率が有意に減少した。また、250 mg/kg群では対照群と比べてALPが有意に増加し、総ビリルビンが有意に減少した。25 mg/kg群では対照群と比べてALAT、総蛋白及びCaが有意に増加した。雌では25及び2.5 mg/kg群で対照群と比べて総コレステロールが有意に減少したが、250 mg/kg群ではいずれの測定項目においても対照群との間に有意な差はみられなかった。

休業期間終了時には雄で対照群と比べて250 mg/kg群の総蛋白、アルブミン及び総コレステロールが有意に増加し、クレアチニン及び $\alpha_2$ -グロブリン比率が有意に減少した。雌では、いずれの測定項目でも250 mg/kg群と対照群との間に有意な差はみられなかった。

#### 10.1.8 器官重量 (Tables 8-1~8-8, Appendices 8-1~8-8)

投与期間終了時では雄の25及び250 mg/kg群で肝臓重量(絶対値及び相対値)が対照群と比べて有意に増加した。雌では2.5 mg/kg群の肝臓重量(相対値)が対照群と比べて有意に減少した。

休業期間終了時では雄の250 mg/kg群の肝臓重量(絶対値及び相対値)及び心臓重量(絶対値及び相対値)が増加した。雌では250 mg/kg群と対照群との間に有意な差はみられなかった。

#### 10.1.9 病理組織学的検査 (Tables 9-1~9-4, Appendices 9-1~9-5)

投与期間終了時の病理組織学的検査は相対及び絶対重量が増加した肝臓を除き、対照群と250 mg/kg群で実施した。

雄では副腎に束状帯細胞の空胞化が対照群及び250 mg/kg群で各2/5例にみられた。心臓では左心室心筋の繊維化が対照群及び250 mg/kg群で各1/5例に、左心室心筋の単核細胞浸潤が250 mg/kg群に2/5例みられた。右心室心筋の単核細胞浸潤が対照群の1/5例にみられた。

雄では腎臓に尿細管の好塩基性変化が対照群及び250 mg/kg群で1/5~3/5例にみられた。対照群にみられた変化として尿細管腔内に硝子円柱、尿細管上皮の空胞化、皮質の鉍質沈着及び単核細胞浸潤が1/5例にみられた。

雄では左肺で肺泡の泡沫細胞蓄積が対照群で2/5例及び250 mg/kg群で1/5例みられた。右肺では肺泡の泡沫細胞蓄積が対照群の1/5例及び250 mg/kg群の2/5例みられた。他に骨化生が対照群の1/5例にみられた。また対照群で動脈壁の鉍質沈着が2/5例、肺泡の単核細胞浸潤が1/5例にみられた。その他の器官には病理組織学的な変化はみられなかった。

雌では左腎臓に尿細管の好塩基性変化が対照群で3/5例、皮質の単核細胞浸潤が1/5例みられ、250 mg/kg群で1/5例に皮質髄質境界部の鉍質沈着がみられた。右腎臓では対照群で皮質の単核細胞浸潤が1/5例、腎盂移行上皮の好酸球浸潤及び腎盂腔内の異物が1/5例に、250 mg/kg群で皮質髄質境界部の鉍質沈着が1/5例にみられた。左肺では肺泡の泡沫細胞蓄積が対照群及び250 mg/kg群で各1/5例みられた。また、対照群では血管周囲の炎症細胞浸潤が1/5例及び

肺胞上皮の増殖が1/5例にみられた。右肺では肺胞の泡沫細胞蓄積が、対照群の1/5例及び250 mg/kg 群の2/5例にみられた。対照群では肉芽腫が1/5例に、250 mg/kg 群の3/5例に動脈壁の鈣質沈着がみられた。また、対照群では気管には線毛上皮の扁平上皮化生が1/5例にみられた。その他の組織には異常はみられなかった。

対照群及びすべての被験物質投与群の病理組織学的検査を実施した肝臓では、雄で単核細胞浸潤が対照群、2.5、25 mg/kg 群及び250 mg/kg 群でみられた。250 mg/kg 群で限局性胆管の増殖がみられた。雌では単核細胞浸潤が対照群及び2.5及び25 mg/kg 群でみられた。その他に肝細胞の空胞化が対照群及び2.5 mg/kg 群でみられた。

投与期間終了時に認められた所見はいずれも軽度で当社背景データにみられる変化であり、発現頻度も対照群と250 mg/kg 群との間に差はみられなかった。

## 10.2 出生児 (F1) の観察

### 10.2.1 出生日の観察 (Tables 10-1, 10-2, 11, Appendices 10-1~10-3, 11-1~11-4)

出産児数及び出生率は、対照群と被験物質群との間に有意な差はみられなかった。外形観察では、いずれの群にも異常はみられなかった。

性比は対照群と被験物質群との間に有意な差はみられなかった。

### 10.2.2 一般状態 (Tables 10-1, 10-2, 11, Appendices 10-1~10-3, 11-1~11-4)

生後4日生存率は、対照群と被験物質群との間に有意な差はなかった。

いずれの群においても一般状態に異常は認められなかった。

### 10.2.3 体重 (Table 12, Appendices 12-1~12-4)

対照群と被験物質群との間に有意な差はみられなかった。

### 10.2.4 生後4日の剖検所見 (Table 13, Appendices 13-1, 13-2)

いずれの群においても異常はみられなかった。

## 11. 考察

2- (3, 5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル) -5-クロロベンゾトリアゾールの0 (対照) , 2.5, 25 及び 250 mg/kg/日を各群雌雄各 10 例の Crj:CD (SD) IGS ラットに 28 日間強制経口投与し、その後交配させて生殖能力を観察するとともに被験物質の反復投与毒性を調べ、さらに 2 週間の休薬期間を設けて発現した毒性の回復性についても検討した。対照群には 5 w/v% アラビアゴム水溶液を被験物質群と同様の方法で投与した。

### 親動物に対する影響

いずれの群においても死亡はなかった。投与期間及び休薬期間を通して一般状態、体重及び摂餌量に被験物質投与の影響はみられなかった。生殖能力については、交尾率、受(授)胎率、交尾成立までの平均日数、妊娠期間、着床痕数及び出産率に、被験物質投与の影響はみられなかった。

投与期間終了時の血液学的検査では、25 mg/kg 群以上の雄で活性化部分トロンボプラスチン時間が短縮した。その他に 250 mg/kg 群では赤血球数が有意に減少し、好中球数が増加した。休薬期間終了時の血液学的検査では雄の 250 mg/kg 群で血小板数及び好中球数が増加した。雌では、25 mg/kg 群以上で好酸球数が減少したが、休薬期間終了時の検査では、被験物質投与の影響はみられなかった。

投与期間終了時の血液生化学的検査では、雄の 25 mg/kg 群以上で、アルブミンが高値を示し、A/G 比が増加し、 $\alpha_2$ -グロブリン比率及び $\beta$ -グロブリン比率が減少した。その他にクレアチニンの低値がみられた。250 mg/kg 群では ALP が増加し総ビリルビンが減少した。また、25 mg/kg 群では ALAT、総蛋白及び Ca が増加した。雌では 2.5 及び 25 mg/kg 群で総コレステロールが減少したが、250 mg/kg 群ではいずれの測定項目においても対照群との間に有意な差はみられなかった。休薬期間終了時の血液生化学的検査では雄の 250 mg/kg 群で総蛋白、アルブミン及び総コレステロールが高値を示し、 $\alpha_2$ -グロブリン比率が減少した。また、クレアチニンが低値を示した。アルブミンの高値及びクレアチニンの低値は投与期間終了時と同様であった。雌では、いずれの測定項目にも被験物質投与の影響はみられなかった。

投与期間終了時及び休薬期間終了時の剖検においては、雄及び雌動物のいずれにも被験物質投与の影響は認められなかった。

投与期間終了時の器官重量では、25 mg/kg 群以上で雄の肝臓重量(絶対値及び相対値)が増加した。雌では被験物質投与の影響は認められなかった。

休薬期間終了時の器官重量では、雄の 250 mg/kg 群の肝臓重量(絶対値及び相対値)及び心臓重量(絶対値及び相対値)が増加した。雌では器官重量に被験物質投与の影響は認められなかった。

投与期間終了時の病理組織学的検査では相対及び絶対重量が増加した肝臓を除き対照群と 250 mg/kg 群で実施した。

投与期間終了時の病理組織学的検査では、250 mg/kg 群の雄で副腎に細胞の空胞化、心臓に心室心筋の繊維化及び単核細胞浸潤がみられた。腎臓では尿細管の好塩基性変化、肺では肺

胞の泡沫細胞蓄積，血管周囲の炎症性細胞浸潤がみられた。

雌では，250 mg/kg 群で腎臓の皮質髄質境界部の鈣質沈着，肺胞の泡沫細胞蓄積，動脈壁の鈣質沈着，気管の線毛上皮の扁平上皮化生，腸間膜リンパ節の樹状細胞様細胞の増加が認められた。

対照群及びすべての被験物質投与群の病理組織学的検査を実施した肝臓では，雄で単核細胞浸潤が対照群，2.5，25 mg/kg 群及び 250 mg/kg 群でみられた。250 mg/kg 群で限局性胆管の増殖がみられた。雌では単核細胞浸潤が対照群及び 2.5 及び 25 mg/kg 群でみられた。その他に 2.5 mg/kg 群で肝細胞の空胞化が対照群及び 2.5 mg/kg 群でみられた。

投与期間終了時の病理組織学的検査で認められた所見はいずれも軽度なもので当社背景データにみられる変化であり，発現頻度も対照群と 250 mg/kg 群との間に差はみられなかった。このように被験物質投与に起因する病理組織学的異常所見がみられなかったことから休業期間終了時の病理組織学的検査は実施しなかった。

#### 出生児への影響

出産児数，出生率，性比及び生後 4 日生存率に被験物質投与の影響はみられなかった。いずれの群にも外形異常児はみられず，一般状態，体重及び生後 4 日の剖検で被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のように，本試験条件下では，雄の 25 mg/kg 群以上の血液生化学的検査でアルブミンの増加等，血液学的検査で活性化部分トロンボプラスチン時間の低下等ならびに肝臓重量の増加がみられたことから，一般毒性学的無毒性量は 2.5 mg/kg/日と判断した。

また，交尾率，妊娠率，出産率及び出生児への影響が認められないことから生殖発生毒性学的無毒性量は 250 mg/kg/日と判断した。

## 6-3. 1,1-ビス(tert-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの がん原性試験

### CARCINOGENICITY STUDY OF 1,1-BIS(*tert*- BUTYLPEROXY)-3,3,5-TRIMETHYLCYCLOHEXANE IN B6C3F<sub>1</sub> MICE

M. MITSUI, F. FURUKAWA, M. SATO, T. ENAMI, T. IMAZAWA, A. NISHIKAWA and M. TAKAHASHI\*

Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,  
Tokyo 158, Japan

(Accepted 14 July 1993)

**Abstract**—1,1-Bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) is widely used in the manufacture of rubber. The present carcinogenicity study in B6C3F<sub>1</sub> mice was carried out in order to assess its potential to induce tumours. BBTC was administered at dietary levels of 0 (control), 0.25 and 0.5% for 78 wk; these dose levels were selected on the basis of a subchronic toxicity study, in which body weights were depressed to less than 90% of the control group values and swelling of hepatocytes was histologically evident in animals fed 1% BBTC or more in the diet. Neoplasms were found in all groups, including the control group, but there were no significant differences between groups of either sex in mortality, tumour incidences or tumour distribution. All tumours were considered to be spontaneous because of the similarity to background data for B6C3F<sub>1</sub> mice. This study thus provides no evidence of carcinogenicity of BBTC in B6C3F<sub>1</sub> mice.

#### INTRODUCTION

1,1-Bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) is widely used as a source of free radicals in the hardening of unsaturated polyester resins and the polymerization of styrene, finding particular application in the rubber industry. Its chemical structure is illustrated in Fig. 1. BBTC is not mutagenic in *Salmonella typhimurium* (E. Machigaki, personal communication, 1987). Although lauroyl peroxide (another source of free radicals used as an initiator in the polymerization of vinyl chloride in rubber manufacture) has also been shown not to be mutagenic in *S. typhimurium* (Yamaguchi and Yamashita, 1980), this compound has been suspected from bioassay data to have carcinogenic potential (Kotin and Falk, 1963). In addition, other free radical sources in the plastics and rubber industries such as *tert*-butylperoxy benzoate (Kotin and Falk, 1963) and benzoyl peroxide (Slaga *et al.*, 1981) have been shown to exert skin tumour-promoting activities or to be suspected carcinogens in preliminary animal studies.

Because BBTC has not been sufficiently examined for its possible toxicity and carcinogenicity despite its wide industrial use, the present investigation was carried out to assess any carcinogenic potential of the compound. This study was performed as a part of the risk re-evaluation of existing chemicals in Japan.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Animals

Male and female B6C3F<sub>1</sub> mice, purchased at the age of 5 wk from Charles River Japan Inc. (Kanagawa, Japan), were maintained on basal diet (MF; Oriental Yeast Ind. Co., Tokyo, Japan) and tap water until they were 6 wk old, when the studies started.

##### Chemical

BBTC (CAS No. 6731-86-8), purchased from Nippon Yushi Co. (Tokyo, Japan), was in a liquid form and was over 90% pure. It was administered orally to animals in the diet as detailed below. The diet supplemented with BBTC was kept at 4°C.

##### Housing conditions

Mice were housed 10 to a plastic cage, with soft-wood chips as bedding. The room was maintained at a temperature of 23 ± 2°C and a humidity of 55 ± 5%, with a 12-hr light/dark cycle.

##### Experimental design

A preliminary subchronic toxicity study was carried out prior to the carcinogenicity study.

**Subchronic toxicity study.** BBTC was added to MF powdered basal diet and fed *ad lib.* to groups of 10 male and 10 female mice at dietary concentrations of 0.5, 1.0, 2.0 or 4.0% for 13 wk. Control animals received the basal diet without BBTC. Throughout the experiment, mice were given tap water *ad lib.* 150 animals were observed daily for clinical signs and

\*To whom correspondence should be addressed.

Abbreviation: BBTC = 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane.

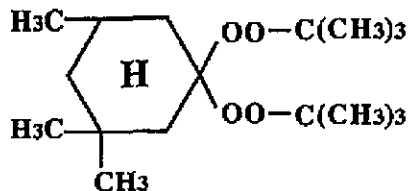


Fig. 1. Chemical structure of 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC).

deaths were recorded. At the end of the experiment, all surviving mice were killed, and major organs/tissues were taken for gross and microscopic examination. The results were used to determine appropriate dose levels for the subsequent carcinogenicity study.

**Carcinogenicity study.** Mice were divided randomly into three groups, each consisting of 50 males and 50 females. BBTC was added to the powdered basal diet at 0 (control), 0.25 or 0.5%. These dose levels were selected according to the results of the subchronic toxicity study. Animals were given their respective diet *ad lib.* for 78 wk, and the amounts of food consumed were measured in order to calculate the actual intakes of BBTC. Throughout the experiment, mice had free access to tap water. All mice were observed daily for clinical signs and deaths were recorded. Body weights were measured once a week for the first 13 wk of the study and then once every 4 wk. After 78 wk, the administration of BBTC was stopped and mice were then maintained on the powdered basal diet until wk 83 when all surviving animals were killed. All mice found dead, killed when moribund or killed at the end of the study were completely autopsied, and their organs were fixed

routinely in 10% buffered formalin, sectioned and stained with haematoxylin and eosin.

**Statistical analysis.** Data were analysed for statistical significance by Fisher's exact probability test and the chi-square test.

## RESULTS

### Subchronic toxicity study

Two males and two females given 4.0% BBTC died during the study, all other mice survived until wk 13. Throughout the experiment, body weight gain and food consumption in the BBTC-treated groups were lower than those of the controls. For both sexes, the only dose of BBTC at which final body weights were in excess of 90% of the control values was 0.5%. Haematological examinations showed a tendency of anaemia in groups of both sexes receiving 1.0% BBTC or more. Relative liver weights were significantly increased in BBTC-treated mice in a dose-dependent manner. In contrast, absolute and relative spleen weights were decreased in a dose-dependent manner. Histopathological examinations revealed swelling of hepatocytes in male and female mice fed 1.0% BBTC or more, and atrophy of the red and white pulp in the spleen as well as a decrease of haematopoietic cells in the bone marrow were observed in males given 2.0 or 4.0% BBTC and in females fed 4.0% BBTC. From these results it was concluded that, with particular consideration given to growth retardation and histopathological findings, the maximum long-term dose of dietary BBTC that can be tolerated would be 0.5% for mice of both sexes. Therefore, 0.25 and 0.5% were selected as

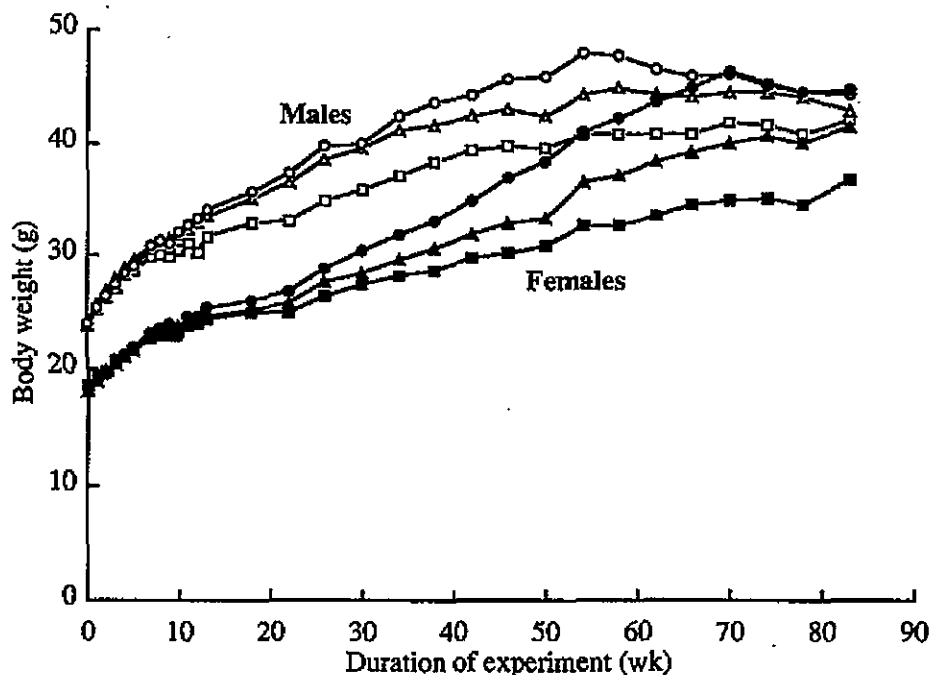


Fig. 2. Growth curves of B6C3F<sub>1</sub> mice given 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in the diet for 78 wk at 0 (males, ○; females, ●), 0.25 (males, △; females, ▲) or 0.5% (males, □; females, ■). Surviving mice were observed for a further 10 wk and killed at 83 wk.

Table 1. Total tumour incidences, food consumption, 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) intake, final survival rate and mean survival time of B6C3F<sub>1</sub> mice given BBTC in the diet for 78 wk

BBTC dose (%)	No. of mice			Food consumption (g/animal/day)	Mean total BBTC intake (g/kg body weight/78 wk)	Final survival rate (%)	Mean survival time and range (wk)
	Initial	Effective	With tumour				
<b>Males</b>							
0	50	49	29	5.6	0	98.0	83.0 (82-83)
0.25	50	48	30	5.1	187	95.8	80.8 (23-83)
0.5	50	50	30	4.7	373	94.0	82.4 (61-83)
<b>Females</b>							
0	50	50	19	6.3	0	94.0	80.6 (15-83)
0.25	50	49	18	6.1	280	94.8	81.9 (47-83)
0.5	50	50	21	5.9	576	96.0	82.7 (73-83)

appropriate dose levels for the subsequent carcinogenicity study.

#### Carcinogenicity study

**Growth and mortality.** The growth curves (Fig. 2) showed a dose-dependent inhibitory effect of BBTC on the growth of mice of both sexes in the 0.25 and 0.5% groups. The survival rates and mean survival times (Table 1), however, indicated no significant differences between groups of either sex.

**Tumour incidence and BBTC intake.** Overall tumour incidences and total intakes of BBTC are

summarized in Table 1. There were no significant differences in total tumour incidences between groups of either sex. Total intakes of BBTC, estimated from the food consumption data, were dose related.

**Distribution and histopathology.** The sites, histological types and incidences of tumours in each group are summarized in Table 2. Tumours were found in various organs from mice of both sexes in each group, including the control group. However, all the tumours were considered to be spontaneous because their incidences were essentially similar to those of spontaneous neoplastic lesions reported previously in

Table 2. Sites and types of tumours in B6C3F<sub>1</sub> mice given 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) in the diet for 78 wk

Site and type of tumour	No. of mice with tumours						
	BBTC dose (%)	Males			Females		
		0	0.25	0.5	0	0.25	0.5
<i>Effective no. of mice</i>		48	47	50	47	47	50
<b>Lung</b>							
Alveolar/bronchiolar adenoma		1	2	1	1	1	1
Alveolar/bronchiolar carcinoma		5	4	0*	0	1	0
<b>Spleen</b>							
Haemangioma		1	0	0	0	0	0
Haemangiosarcoma		1	0	0	1	0	0
<b>Haematopoietic system</b>							
Lymphoma		6	5	8	13	12	11
Histiocytic sarcoma		1	0	0	0	2	2
<b>Small intestine</b>							
Adenoma		0	1	0	0	0	0
Adenocarcinoma		0	1	0	0	0	0
<b>Liver</b>							
Hepatocellular adenoma		15	20	20	0	0	0
Hepatocellular carcinoma		8	7	7	0	0	0
Haemangioma		0	1	0	0	0	0
Haemangiosarcoma		1	1	0	0	0	0
<b>Pancreas</b>							
Acinar cell adenoma		0	0	0	0	0	1
Islet cell adenoma		1	1	0	0	0	0
<b>Kidney</b>							
Renal cell carcinoma		1	0	0	0	0	0
<b>Adrenal gland</b>							
Phaeochromocytoma		0	0	2	0	0	1
Cortical adenoma		0	0	0	0	1	1
<b>Thyroid gland</b>							
Follicular cell adenoma		0	0	0	1	0	0
<b>Pituitary gland</b>							
Adenoma (pars distalis)		0	0	0	1	0	0
<b>Uterus</b>							
Endometrial stromal polyp		—	—	—	1	0	0
Endometrial stromal sarcoma		—	—	—	1	1	2
<b>Harderian gland</b>							
Adenoma		5	3	0*	2	2	4
Adenocarcinoma		1	0	1	0	0	1
<b>Skin/subcutis</b>							
Schwannoma, malignant		0	1	0	0	0	0
Mastocytoma		0	0	0	0	0	1

\*Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ).



Table 3. Incidences of total tumours and malignant tumours in B6C3F<sub>1</sub> mice given 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) in the diet for 78 wk

Parameter	BBTC dose (%)	Males			Females		
		0	0.25	0.5	0	0.25	0.5
Effective no. of mice		49	48	50	50	49	50
No. of mice with tumours		29	30	30	19	18	21
Tumours/animal		0.94	0.94	0.78	0.42	0.41	0.48
No. of mice with malignant tumours		22	16	15	14	15	15
Malignant tumours/animal		0.49	0.39	0.32	0.30	0.33	0.30

B6C3F<sub>1</sub> mice (Tamano *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1979). BBTC treatment did not increase the incidences of any benign or malignant tumours (Table 3). Although the incidences of lymphomas and those of lung and Harderian gland tumours in both sexes, and liver tumours in males were relatively high in the control group compared with background data, there were no significant differences. Interestingly, the incidences of lung carcinomas and Harderian gland adenomas in male mice were decreased in a dose-dependent manner with statistical significance in the high-dose group.

*Non-neoplastic lesions.* Although non-neoplastic lesions were observed frequently in all groups, including the controls, no significant differences were found between groups. Swelling of centrilobular hepatocytes, as observed in the subchronic toxicity study, was evident only in male mice fed 0.5% BBTC.

#### DISCUSSION

Tumours of the liver, haematopoietic organs, lung and Harderian gland are known to develop spontaneously in mice of the B6C3F<sub>1</sub> strain (Tamano *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1979). In the present study, BBTC administration neither increased the incidences of such spontaneous tumours nor induced any unusual neoplasms. Slight but significant decreases in the incidences of lung carcinomas and Harderian gland adenomas were associated with BBTC treatment. With regard to lung carcinomas, similar results have previously been reported for cyclohexane (Lijinsky and Kovach, 1986). The present results therefore suggest that BBTC may inhibit directly the development of some spontaneous tumours; however, the dose-dependent decreases in food consumption and body weight gain in the BBTC-treated groups may have acted as factors that suppress tumour development. Based on the fact that the incidences of both lung and Harderian gland tumours in the control group were elevated compared with earlier background data (Tamano *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1979), together with the finding that the total tumour incidences were similar to those found in previous studies (Tamano *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1979), the inhibitory effects were likely to be of little significance, if any.

Peroxides are widely used as a source of free radicals in various industries. Recently, free radicals have been suggested to play important biological

roles, especially in carcinogenic processes. In fact, some peroxides such as *tert*-butylperoxy benzoate and benzoyl peroxide, which are functionally similar to BBTC, are known to be mutagenic (Mortelmans *et al.*, 1986; Saladino *et al.*, 1985) and carcinogenic (Kotin and Falk, 1963) or co-carcinogenic (Slaga *et al.*, 1981). The hepatotoxicity and haematotoxicity of BBTC were noted in the present subchronic toxicity study, but no nephrotoxicity was observed, despite the finding that cyclohexane and tetramethylcyclohexanes, which have structural resemblances to BBTC, are nephrotoxic in rats (Bernard *et al.*, 1989; Johannsen and Levinskas, 1987). The observed hepatotoxicity could have been caused by the induction of cytochrome P-450 enzyme activity, since it has been shown that the structurally similar hexachlorocyclohexane induces this activity in the liver (Popp and Cattley, 1991). Persistent induction of the cytochrome P-450 enzyme may give rise to subsequent hepatocarcinogenesis. The haematotoxicity might have been caused primarily by the damage of the haematopoietic organs, although nutritional impairment could, to some extent, contribute to its occurrence. Despite the cytotoxicity in the liver and haematopoietic organs, there were no significant increases caused by BBTC in the incidences of neoplasms in these organs.

It was therefore concluded that BBTC exerts no carcinogenic activity in B6C3F<sub>1</sub> mice. However, while cyclohexane has been suspected as a mutagen from the results of DNA-cell binding assays (Kubinski *et al.*, 1981) and is also known to be a skin tumour promoter in mice, it is not a complete carcinogen (Gupta and Mehrottra, 1990). Thus, although BBTC has been shown not to be mutagenic in the Ames test, the possibility that it can act as a tumour promoter requires further elucidation.

*Acknowledgement*—This work was supported by a Grant-in-Aid for Safety Evaluation of Existing Chemicals from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

#### REFERENCES

- Bernard A. M., de Russus R., Normand J. C. and Lauwerys R. R. (1989) Evaluation of the subacute nephrotoxicity of cyclohexane and other industrial solvents in the female Sprague-Dawley rat. *Toxicology Letters* 45, 271-280.
- Gupta K. P. and Mehrottra N. K. (1990) Mouse skin ornithine decarboxylase induction and tumor promotion by cyclohexane. *Cancer Letters* 51, 227-233.

- Johannsen F. R. and Levinskas G. J. (1987) Acute and subchronic toxicity of tetramethylcyclohexanes. *Journal of Applied Toxicology* 7, 245-248.
- Kotin P. and Falk H. L. (1963) Organic peroxides, hydrogen peroxide, epoxides, and neoplasia. *Radiation Research Supplement* 3, 193-211.
- Kubinski H., Gutzke G. E. and Kubinski Z. O. (1981) DNA-cell binding assay for suspected carcinogens and mutagens. *Mutation Research* 89, 95-136.
- Lijinsky W. and Kovatch R. M. (1986) Chronic toxicity study of cyclohexane in rats and mice. *Journal of the National Cancer Institute* 77, 941-949.
- Mortelmans K., Hawarth S., Lawlor T., Speck W., Tainer B. and Zeiger E. (1986) Salmonella mutagenicity tests. II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environmental Mutagenicity* 8, (Suppl. 7), 1-26.
- Popp J. A. and Cattley R. C. (1991) Hepatobiliary System. In *Handbook of Toxicologic Pathology*. Edited by W. M. Haschek and R. C. Cattley. pp. 279-314. Academic Press, New York.
- Saladino A. J., Willey J. C., Lechner J. F., Grafstrom R. C., LaVeck M. and Harris C. C. (1985) Effects of formaldehyde, benzoyl peroxide, and hydrogen peroxide on cultured normal human bronchial epithelial cells. *Cancer Research* 45, 2522-2526.
- Slaga J. J., Klein-Szanto A. J. P., Triplett L. L. and Yotti L. P. (1981) Skin tumor producing activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical generating compound. *Science* 213, 1023-1024.
- Tamano S., Hagiwara A., Shibata M., Kurata Y., Fukushima S. and Ito N. (1988) Spontaneous tumors in aging (C57BL/6N x C3H/Hen)F<sub>1</sub> (B6C3F<sub>1</sub>) mice. *Toxicologic Pathology* 16, 321-326.
- Ward J. M., Goodman D. G., Squire R. A., Chu K. C. and Linhart M. S. (1979) Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N x C3H/Hen)F<sub>1</sub> mice. *Journal of the National Cancer Institute* 63, 849-854.
- Yamaguchi T. and Yamashita Y. (1980) Mutagenicity of hydroperoxides of fatty acids and some hydrocarbons. *Agricultural Biology and Chemistry* 44, 1675-1678.

6-4. 1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘサンのその他の毒性情報

他の毒性情報	<p>[三井ら：衛生試験所報告,110, 42-47,1992 より引用]</p> <p>反復投与毒性試験</p> <p>B6C3F<sub>1</sub>マウス (0.5, 1.0, 2.0, 4.0%(混餌投与)) 13週間 純度90%以上          {♂：800, 1500, 3200, 6000 mg/kg/day 相当、          ♀：1000, 1700, 3100, 6500 mg/kg/day 相当}</p> <p>NOEL：&lt;0.5%(800 mg/kg/day)</p> <p>死亡(4.0：♂8/10・♀8/10)</p> <p>一般状態(消瘦：2.0以上♂♀)</p> <p>体重↓(1.0以上♂♀)</p> <p>摂餌量↓：0.5以上♂♀</p> <p>血液学的検査(Hgb↓・MCV↓：2.0♂♀、Hct↓・WBC↓：2.0♂)</p> <p>相対重量(肝↑：0.5以上♂♀)</p> <p>病理組織学的所見(肝-小葉中心性細胞肥大：1.0以上♂♀、          骨髄-造血細胞減少/うっ血：2.0以上♂♀、          脾-白脾髄/赤脾髄萎縮：2.0以上♂・4.0♀)</p>
--------	--

Table 10 Necropsy findings  
Male, Female, 13w

Organs and findings	Sex	Male				Female			
	Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
	Number of animals	10	9	10	9	10	10	10	10
Genital system									
Testis						NA	NA	NA	NA
Enlargement		0	1	0	0	NA	NA	NA	NA
Epididymis									
Nodule, light yellow		0	0	1	0				
Endocrine system									
Pituitary									
Enlargement		0	0	0	0	0	0	0	1
Special sense organs									
Eye									
Dyscoria		1	0	0	0	0	0	0	0

Not significantly different from control.

NA: not applicable.

No appreciable changes in all other organs and tissues.

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 11 Necropsy findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex	Male				Female			
	Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
	Number of animals	10	8	8	10	10	10	9	10
Digestive system									
Liver									
Macule, dark red		0	0	0	1	1	1	0	0
Enlargement		0	0	1	4	0	0	0	3
Mass, light gray		1	0	0	0	0	0	0	0
Pancreas									
Mass, light gray		0	1	0	0	0	0	0	0
Hematopoietic system									
Thymus									
Small		10	8	8	10	10	10	9	10
Spleen									
Enlargement		0	0	0	1	0	1	0	0
Cyst		0	0	0	0	1	0	0	0
Urinary system									
Kidney									
Rough, surface		0	1	0	0	0	0	0	0
Dilatation, pelvic cavity		0	1	0	0	1	0	0	0
Genital system									
Testis									
Softening		1	0	1	0	NA	NA	NA	NA
Small		0	0	1	0				
Uterus									
Enlargement		NA	NA	NA	NA				
Cyst, endometrium						0	1	0	0
Mammary gland									
Retention, milk		0	1	0	0	7	1*	3	3
Endocrine system									
Pituitary									
Spot, dark red		0	0	1	1	1	1	1	0
Mass, dark red		0	0	1	1	0	1	0	0
Thyroid									
Nodule, light gray		0	0	1	0	0	0	0	0

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

NA: not applicable.

No appreciable changes in all other organs and tissues.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 11 - continued

Necropsy findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex	Male				Female			
	Group and dose	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	Control	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
	Number of animals	10	8	8	10	10	10	9	10
Endocrine system									
Adrenal									
Spot, brown		0	0	0	0	4	1	2	1
Enlargement		0	0	0	0	0	1	0	0
Nodule, brown		0	0	0	0	2	0	0	0
Integumentary system									
Integument									
Mass, subcutis, light gray		1	0	0	0	2	2	2	3
Others									
Extremity									
Swelling, hindlimb		0	0	1	0	0	0	0	1
Corn, hindlimb		4	2	2	4	2	2	1	2

Not significantly different from control.

No appreciable changes in all other organs and tissues.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 12 Absolute and relative organ weights  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		Final body weight	Brain		Pituitary		Thyroids		Heart	
			(g)	(g)	(g/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	609.0	2.37	0.39	15.5	2.6	24.6	4.0	1.69	0.28
		S.D.	±49.7	±0.08	±0.03	±2.1	±0.3	±3.4	±0.6	±0.17	±0.02
	4 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	582.8	2.36	0.41	14.8	2.6	20.9	3.6	1.66	0.29
		S.D.	±62.6	±0.07	±0.05	±1.8	±0.3	±5.1	±0.9	±0.17	±0.02
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	593.6	2.29	0.39	14.9	2.5	26.3	4.4	1.61	0.27
		S.D.	±42.4	±0.12	±0.03	±2.7	±0.3	±4.3	±0.7	±0.15	±0.02
	100 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	628.5	2.33	0.37	15.0	2.4	26.4	4.2	1.67	0.27
		S.D.	±37.9	±0.07	±0.02	±2.0	±0.3	±4.5	±0.8	±0.16	±0.02
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	316.4	2.05	0.65	17.3	5.6	16.9	5.4	1.02	0.32
		S.D.	±25.1	±0.06	±0.05	±2.7	±1.2	±2.2	±0.8	±0.10	±0.03
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	306.7	2.06	0.67	18.2	5.9	16.0	5.3	0.96	0.31
		S.D.	±17.6	±0.07	±0.03	±3.1	±0.9	±2.8	±1.0	±0.07	±0.02
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	314.6	2.10	0.67	19.2	6.1	16.8	5.4	1.03	0.33
		S.D.	±34.6	±0.07	±0.06	±3.0	±0.8	±2.5	±0.6	±0.11	±0.02
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	307.4	2.13	0.70	19.3	6.3	19.7	6.4*	0.99	0.33
		S.D.	±29.4	±0.06	±0.07	±4.0	±1.0	±3.9	±1.1	±0.09	±0.03

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 12 - continued Absolute and relative organ weights  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		Lungs		Thymus		Liver		Spleen	
			(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.71	0.28	0.31	0.05	16.72	2.75	0.91	0.15
		S.D.	±0.10	±0.02	±0.10	±0.02	±1.53	±0.13	±0.13	±0.01
	4 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	1.64	0.28	0.33	0.06	16.25	2.79	0.87	0.15
		S.D.	±0.15	±0.02	±0.09	±0.02	±2.42	±0.23	±0.10	±0.02
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.63	0.28	0.30	0.05	16.94	2.85	0.81	0.14
		S.D.	±0.14	±0.03	±0.10	±0.02	±1.83	±0.21	±0.12	±0.01
	100 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	1.72	0.28	0.28	0.05	20.20**	3.21**	0.88	0.14
		S.D.	±0.10	±0.02	±0.07	±0.01	±1.76	±0.20	±0.14	±0.02
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.14	0.36	0.27	0.09	8.24	2.61	0.51	0.16
		S.D.	±0.07	±0.02	±0.06	±0.02	±0.81	±0.20	±0.05	±0.02
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.19	0.39	0.27	0.09	8.42	2.75	0.50	0.16
		S.D.	±0.07	±0.03	±0.06	±0.02	±0.65	±0.19	±0.07	±0.02
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.22	0.39	0.27	0.08	9.24	2.93**	0.55	0.18
		S.D.	±0.10	±0.04	±0.06	±0.02	±1.40	±0.21	±0.07	±0.02
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.22	0.40*	0.28	0.09	10.51**	3.42**	0.51	0.17
		S.D.	±0.09	±0.03	±0.08	±0.03	±1.18	±0.23	±0.06	±0.02

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.



Table 12 - continued Absolute and relative organ weights  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		Kidneys		Adrenals		Epididymides		Testes	
			(g)	(g/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	3.63	0.60	61.5	10.1	1.36	0.23	3.59	0.59
		S.D.	±0.19	±0.05	±5.9	±1.1	±0.06	±0.03	±0.32	±0.06
	4 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	3.70	0.64	60.4	10.4	1.40	0.24	3.78	0.66
		S.D.	±0.45	±0.05	±10.8	±1.7	±0.09	±0.03	±0.62	±0.13
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	3.69	0.62	58.3	9.8	1.35	0.23	3.45	0.58
		S.D.	±0.52	±0.07	±8.6	±1.2	±0.18	±0.02	±0.31	±0.05
	100 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	4.01	0.64	59.6	9.5	1.34	0.21	3.59	0.57
		S.D.	±0.55	±0.06	±4.9	±0.8	±0.13	±0.03	±0.34	±0.05
Female	Control	N	10	10	10	10				
		Mean	1.88	0.60	67.0	21.3				
		S.D.	±0.15	±0.05	±7.5	±2.6				
	4 mg/kg	N	10	10	10	10				
		Mean	1.87	0.61	64.9	21.1				
		S.D.	±0.14	±0.04	±9.4	±2.6				
	20 mg/kg	N	10	10	10	10				
		Mean	2.01	0.64	66.4	21.1				
		S.D.	±0.21	±0.04	±11.2	±2.0				
	100 mg/kg	N	10	10	10	10				
		Mean	2.01	0.65*	68.7	22.4				
		S.D.	±0.19	±0.05	±9.5	±2.5				

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 12 - continued  
Absolute and relative organ weights  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		Ovaries		Uterus	
			(mg)	(mg/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N				
		Mean				
		S. D.				
	4 mg/kg	N				
Mean						
S. D.						
20 mg/kg	N					
	Mean					
	S. D.					
100 mg/kg	N					
	Mean					
	S. D.					
Female	Control	N	10	10	10	10
		Mean	77.7	24.6	0.65	0.21
		S. D.	±10.4	±3.4	±0.15	±0.06
	4 mg/kg	N	10	10	10	10
		Mean	77.7	25.4	0.72	0.24
		S. D.	±9.1	±3.0	±0.17	±0.06
	20 mg/kg	N	10	10	10	10
		Mean	82.4	26.4	0.64	0.21
		S. D.	±10.2	±4.1	±0.11	±0.03
	100 mg/kg	N	10	10	10	10
		Mean	81.3	26.5	0.61	0.20
		S. D.	±8.8	±2.5	±0.13	±0.06

Not significantly different from control.

Table 13 Absolute and relative organ weights  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		Final body weight	Brain		Pituitary		Thyroids		Heart	
			(g)	(g)	(g/100 gB. W.)	(mg)	(mg/100 gB. W.)	(mg)	(mg/100 gB. W.)	(g)	(g/100 gB. W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	853.9	2.52	0.30	17.3	2.0	33.1	3.9	2.05	0.24
		S.D.	±106.6	±0.13	±0.04	±3.8	±0.4	±5.2	±0.7	±0.23	±0.02
	4 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	801.5	2.44	0.31	16.0	2.0	37.3	4.7	1.89	0.24
		S.D.	±79.6	±0.08	±0.03	±1.9	±0.2	±7.2	±1.0	±0.15	±0.01
	20 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	846.9	2.42	0.29	25.9	3.2	34.1	4.0	1.93	0.23
		S.D.	±138.4	±0.08	±0.04	±18.1	±2.8	±10.1	±0.7	±0.24	±0.01
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	884.2	2.48	0.29	32.6	3.6	42.1*	4.8*	1.99	0.23
		S.D.	±135.7	±0.08	±0.04	±48.0	±4.9	±7.5	±0.5	±0.28	±0.02
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	432.9	2.11	0.50	27.3	6.4	23.8	5.6	1.21	0.28
		S.D.	±77.3	±0.11	±0.08	±6.1	±1.6	±5.2	±1.2	±0.10	±0.03
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	408.3	2.10	0.52	46.8	12.2	22.2	5.4	1.18	0.29
		S.D.	±53.6	±0.10	±0.07	±47.8	±14.4	±6.2	±1.3	±0.12	±0.04
	20 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	435.3	2.12	0.49	36.3	8.3	23.8	5.5	1.22	0.28
		S.D.	±38.5	±0.06	±0.05	±15.3	±3.4	±1.6	±0.5	±0.11	±0.02
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	452.8	2.18	0.50	32.4	7.4	26.9	6.1	1.29	0.29
		S.D.	±93.4	±0.08	±0.11	±7.8	±2.4	±3.7	±0.9	±0.18	±0.03

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 13 - continued Absolute and relative organ weights  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		Lungs		Thymus		Liver		Spleen	
			(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.93	0.23	0.11	0.01	20.37	2.40	1.01	0.12
		S.D.	±0.19	±0.03	±0.03	±0.00	±1.92	±0.15	±0.16	±0.02
	4 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	1.88	0.24	0.09	0.01	19.58	2.42	1.05	0.13
		S.D.	±0.13	±0.02	±0.03	±0.00	±4.28	±0.33	±0.35	±0.03
	20 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	1.94	0.23	0.09	0.01	20.56	2.42	0.97	0.11
		S.D.	±0.20	±0.02	±0.02	±0.00	±5.01	±0.34	±0.19	±0.02
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.97	0.23	0.10	0.01	25.21*	2.86**	1.32	0.15
		S.D.	±0.18	±0.02	±0.03	±0.00	±4.20	±0.27	±0.42	±0.06
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.30	0.31	0.10	0.02	10.00	2.34	0.60	0.14
		S.D.	±0.08	±0.04	±0.03	±0.01	±1.17	±0.27	±0.09	±0.02
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.32	0.33	0.08	0.02	11.09	2.73*	0.72	0.18
		S.D.	±0.09	±0.03	±0.02	±0.01	±1.61	±0.36	±0.30	±0.10
	20 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	1.36	0.31	0.10	0.02	11.77*	2.71*	0.64	0.15
		S.D.	±0.08	±0.03	±0.03	±0.00	±1.20	±0.19	±0.15	±0.03
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.37	0.32	0.08	0.02	15.66**	3.48**	0.74	0.17
		S.D.	±0.08	±0.07	±0.02	±0.01	±3.19	±0.41	±0.21	±0.05

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 13 - continued Absolute and relative organ weights  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		Kidneys		Adrenals		Epididymides		Testes	
			(g)	(g/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	4.20	0.50	63.4	7.5	1.43	0.17	3.87	0.46
		S.D.	±0.38	±0.05	±7.3	±0.7	±0.18	±0.03	±0.39	±0.06
	4 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	4.10	0.51	65.7	8.2	1.43	0.18	3.87	0.49
		S.D.	±0.46	±0.03	±12.1	±0.8	±0.15	±0.02	±0.33	±0.06
	20 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	4.23	0.50	64.1	7.7	1.27	0.15	3.56	0.42
		S.D.	±0.73	±0.05	±6.1	±1.5	±0.25	±0.03	±0.77	±0.08
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	4.61	0.53	68.0	7.8	1.31	0.15	3.83	0.44
		S.D.	±0.68	±0.08	±13.5	±1.4	±0.15	±0.03	±0.54	±0.05
Female	Control	N	10	10	10	10				
		Mean	2.29	0.54	83.8	19.7				
		S.D.	±0.26	±0.10	±18.3	±4.5				
	4 mg/kg	N	10	10	10	10				
		Mean	2.31	0.57	80.4	19.9				
		S.D.	±0.30	±0.07	±12.6	±3.3				
	20 mg/kg	N	9	9	9	9				
		Mean	2.45	0.56	77.1	17.9				
		S.D.	±0.30	±0.06	±13.3	±3.8				
	100 mg/kg	N	10	10	10	10				
		Mean	2.75**	0.63	81.3	18.6				
		S.D.	±0.33	±0.12	±17.3	±5.5				

\*\* : P<0.01 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 13 - continued  
Absolute and relative organ weights  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		Ovaries		Uterus	
			(mg)	(mg/100 gB. W.)	(g)	(g/100 gB. W.)
Male	Control	N				
		Mean				
		S.D.				
	4 mg/kg	N				
Mean						
S.D.						
20 mg/kg	N					
	Mean					
	S.D.					
100 mg/kg	N					
	Mean					
	S.D.					
Female	Control	N	10	10	10	10
		Mean	51.4	12.2	0.95	0.23
		S.D.	±10.3	±3.1	±0.19	±0.07
	4 mg/kg	N	10	10	10	10
		Mean	48.7	11.9	1.22	0.30
		S.D.	±12.1	±2.3	±0.43	±0.11
	20 mg/kg	N	9	9	9	9
		Mean	52.1	12.0	1.03	0.24
		S.D.	±15.8	±4.0	±0.25	±0.06
	100 mg/kg	N	10	10	10	10
		Mean	56.8	13.1	1.03	0.24
		S.D.	±19.5	±5.2	±0.18	±0.06

Not significantly different from control.  
One female in the 20 mg/kg group died.

Table 14 Histopathological findings  
Male, Female, 13w

Organs and findings	Sex		Male														
	Group and dose		Control					4 mg/kg					20 mg/kg				
	Number of animals		10					9					10				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total		
Digestive system																	
Tongue																	
Esophagus																	
Stomach																	
Duodenum																	
Jejunum																	
Ileum																	
Cecum																	
Colon																	
Rectum																	
Submaxillary gland																	
Sublingual gland																	
Parotid gland																	
Liver																	
Degeneration, hepatocyte, fatty, centrilobular	10	0	0	0	0	9	0	0	0	0	8	2	0	0	2		
Degeneration, hepatocyte, fatty, periportal	7	3	0	0	3	6	3	0	0	3	5	5	0	0	5		
Necrosis, hepatocyte, focal	10	0	0	0	0	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	10	0	0	0	0	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Cellular infiltration, mononuclear cell	10	0	0	0	0	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Fibrosis	9	1	0	0	1	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Pancreas																	
Atrophy, acinus, focal	8	2	0	0	2												
Cellular infiltration, mixed	9	1	0	0	1												
Respiratory system																	
Trachea																	
Lung																	
Metaplasia, osseous	7	3	0	0	3												
Accumulation, foam cell, alveolus	9	1	0	0	1												
Mineralization, artery	9	1	0	0	1												
Hematopoietic system																	
Thymus																	
Submaxillary lymph node																	

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Table 14 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 13w

Organs and findings	Sex	Group and dose	Male														
			Control					4 mg/kg					20 mg/kg				
			10					9					10				
			-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
<b>Hematopoietic system</b>																	
Mesenteric lymph node				(10)				(0)						(10)			
Accumulation, foam cell	10	0	0	0	0						10	0	0	0	0	0	
Spleen				NR(10)				(0)						(0)			
Bone marrow (sternum)				NR(10)				(0)						(0)			
Bone marrow (femur)				NR(10)				(0)						(0)			
<b>Cardiovascular system</b>																	
<b>Heart</b>																	
Cellular infiltration, mononuclear cell	8	2	0	0	2									(0)			
Fibrosis, myocardium	9	1	0	0	1									(0)			
<b>Aorta</b>																	
				NR(10)				(0)						(0)			
<b>Urinary system</b>																	
<b>Kidney</b>																	
Tubule, basophilic	6	4	0	0	4	6	3	0	0	3	8	2	0	0	2		
Droplet, epithelial cell, proximal tubule, hyaline	10	0	0	0	0	9	0	0	0	0	7	3	0	0	3		
Cast, proteinaceous	10	0	0	0	0	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Cyst, medulla	10	0	0	0	0	8	1	0	0	1	10	0	0	0	0		
Cellular infiltration, mononuclear cell, pelvis	10	0	0	0	0	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Fibrosis, medulla	10	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9	1	0	0	1		
Mineralization, cortex	9	1	0	0	1	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Mineralization, medulla	9	1	0	0	1	8	1	0	0	1	9	1	0	0	1		
<b>Urinary bladder</b>																	
Granuloma, adventitia	10	0	0	0	0				(0)					(0)			
<b>Genital system</b>																	
<b>Testis</b>																	
				NR(10)				(0)						(0)			
<b>Epididymis</b>																	
				NR(10)				(0)						(0)			
<b>Prostate</b>																	
				(10)				(0)						(0)			
Cellular infiltration, mononuclear cell	7	3	0	0	3									(0)			
<b>Seminal vesicle</b>																	
				NR(10)				(0)						(0)			
<b>Ovary</b>																	
				NA				NA						NA			
<b>Uterus</b>																	
				NA				NA						NA			

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

NA: not applicable.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.



Table 14 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 13w

Organs and findings	Sex Group and dose Number of animals	Male														
		Control					4 mg/kg					20 mg/kg				
		10					9					10				
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
<b>Genital system</b>																
Vagina																
Degeneration, epithelium, mucous																
Mammary gland																
<b>Endocrine system</b>																
Pituitary																
Cyst, anterior lobe	10	0	0	0	0											
Thyroid																
Remnant, ultimobranchial body	9	1	0	0	1											
Parathyroid																
Adrenal																
Hypertrophy, cortical cell, focal	9	1	0	0	1											
<b>Nervous system</b>																
Cerebrum																
Cerebellum																
Medulla oblongata																
Spinal cord																
Optic nerve																
Sciatic nerve																
<b>Special sense organs</b>																
Eye																
Dysplasia, retina	9	1	0	0	1											
Harderian gland																
<b>Musculoskeletal system</b>																
M. biceps femoris																
Sternum																
Femur																
<b>Integumentary system</b>																
Integument																

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

NA: not applicable.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Table 14 - continued

Histopathological findings  
Male, Female, 13w

Organs and findings	Sex		Male					Female									
	Group and dose		100 mg/kg					Control					4 mg/kg				
	Number of animals		9					10					10				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total		
<b>Digestive system</b>																	
Tongue					NR (9)					NR (10)					(0)		
Esophagus					NR (9)					NR (10)					(0)		
Stomach					NR (9)					NR (10)					(0)		
Duodenum					NR (9)					NR (10)					(0)		
Jejunum					NR (9)					NR (10)					(0)		
Ileum					NR (9)					NR (10)					(0)		
Cecum					NR (9)					NR (10)					(0)		
Colon					NR (9)					NR (10)					(0)		
Rectum					NR (9)					NR (10)					(0)		
Submaxillary gland					NR (9)					NR (10)					(0)		
Sublingual gland					NR (9)					NR (10)					(0)		
Parotid gland					NR (9)					NR (10)					(0)		
Liver					(9)					(10)					(10)		
Degeneration, hepatocyte, fatty, centrilobular	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Degeneration, hepatocyte, fatty, periportal	6	3	0	0	3	9	1	0	0	1	9	1	0	0	1		
Necrosis, hepatocyte, focal	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1		
Hyper trophy, hepatocyte, centrilobular	7	2	0	0	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Cellular infiltration, mononuclear cell	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Fibrosis	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Pancreas					(9)					(10)					(0)		
Atrophy, acinus, focal	9	0	0	0	0	9	1	0	0	1							
Cellular infiltration, mixed	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0							
<b>Respiratory system</b>																	
Trachea					NR (9)					NR (10)					(0)		
Lung					(9)					(10)					(0)		
Metaplasia, osseous	7	2	0	0	2	10	0	0	0	0							
Accumulation, foam cell, alveolus	8	1	0	0	1	10	0	0	0	0							
Mineralization, artery	5	4	0	0	4	8	2	0	0	2							
<b>Hematopoietic system</b>																	
Thymus					NR (9)					NR (10)					(0)		
Submaxillary lymph node					NR (9)					NR (10)					(0)		

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 100 mg/kg group died.

Table 14 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 13w

Organs and findings	Sex		Male					Female									
	Group and dose		100 mg/kg					Control					4 mg/kg				
	Number of animals		9					10					10				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total		
<b>Hematopoietic system</b>																	
Mesenteric lymph node			(9)					(10)						(0)			
Accumulation, foam cell	7	2	0	0	2	10	0	0	0	0							
Spleen			NR(9)					NR(10)						(0)			
Bone marrow (sternum)			NR(9)					NR(10)						(0)			
Bone marrow (femur)			NR(9)					NR(10)						(0)			
<b>Cardiovascular system</b>																	
<b>Heart</b>																	
Cellular infiltration, mononuclear cell	5	4	0	0	4	10	0	0	0	0				(0)			
Fibrosis, myocardium	7	2	0	0	2	10	0	0	0	0							
<b>Aorta</b>																	
			NR(9)					NR(10)						(0)			
<b>Urinary system</b>																	
<b>Kidney</b>																	
Tubule, basophilic	5	4	0	0	4	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Droplet, epithelial cell, proximal tubule, hyaline	4	5	0	0	5**	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Cast, proteinaceous	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Cyst, medulla	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Cellular infiltration, mononuclear cell, pelvis	8	1	0	0	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Fibrosis, medulla	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Mineralization, cortex	6	3	0	0	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Mineralization, medulla	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1		
<b>Urinary bladder</b>																	
Granuloma, adventitia	9	0	0	0	0	9	1	0	0	1				(0)			
<b>Genital system</b>																	
Testis			NR(9)					NA						NA			
Epididymis			NR(9)					NA						NA			
Prostate			(9)					NA						NA			
Cellular infiltration, mononuclear cell	7	2	0	0	2												
Seminal vesicle			NR(9)					NA						NA			
Ovary			NA					NR(10)						(0)			
Uterus			NA					NR(10)						(0)			

\*\* : P&lt;0.01 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

NA: not applicable.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 100 mg/kg group died.

Table 14 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 13w

Organs and findings	Sex		Male					Female									
	Group and dose		100 mg/kg					Control					4 mg/kg				
	Number of animals		9					10					10				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total		
Genital system																	
Vagina			NA							(10)					(0)		
Degeneration, epithelium, mucous						10	0	0	0	0					0		
Mammary gland			NR(9)							NR(10)					(0)		
Endocrine system																	
Pituitary																	
Cyst, anterior lobe	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0					0		
Thyroid																	
Remnant, ultimobranchial body	6	3	0	0	3	6	4	0	0	4					0		
Parathyroid																	
Adrenal			NR(9)							NR(10)					(0)		
Hypertrophy, cortical cell, focal	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0					0		
Nervous system																	
Cerebrum																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		
Cerebellum																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		
Medulla oblongata																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		
Spinal cord																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		
Optic nerve																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		
Sciatic nerve																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		
Special sense organs																	
Eye																	
Dysplasia, retina	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0					0		
Harderian gland																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		
Musculoskeletal system																	
M. biceps femoris																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		
Sternum																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		
Femur																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		
Integumentary system																	
Integument																	
			NR(9)							NR(10)					(0)		

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

NA: not applicable.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 100 mg/kg group died.

Table 14 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 13w

Organs and findings	Sex		Female							
	Group and dose		20 mg/kg		100 mg/kg					
	Number of animals		10		10					
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Digestive system										
Tongue			(0)							NR (10)
Esophagus			(0)							NR (10)
Stomach			(0)							NR (10)
Duodenum			(0)							NR (10)
Jejunum			(0)							NR (10)
Ileum			(0)							NR (10)
Cecum			(0)							NR (10)
Colon			(0)							NR (10)
Rectum			(0)							NR (10)
Submaxillary gland			(0)							NR (10)
Sublingual gland			(0)							NR (10)
Parotid gland			(0)							NR (10)
Liver			(10)							(10)
Degeneration, hepatocyte, fatty, centrilobular	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Degeneration, hepatocyte, fatty, periportal	8	2	0	0	2	6	4	0	0	4
Necrosis, hepatocyte, focal	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	8	2	0	0	2	1	8	1	0	9**
Cellular infiltration, mononuclear cell	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0
Fibrosis	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Pancreas			(0)							(10)
Atrophy, acinus, focal						10	0	0	0	0
Cellular infiltration, mixed						10	0	0	0	0
Respiratory system										
Trachea			(0)							NR (10)
Lung			(0)							(10)
Metaplasia, osseous						10	0	0	0	0
Accumulation, foam cell, alveolus						10	0	0	0	0
Mineralization, artery						8	2	0	0	2
Hematopoietic system										
Thymus			(0)							NR (10)
Submaxillary lymph node			(0)							NR (10)

\*\* : P&lt;0.01 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 14 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 13w

Organs and findings	Sex		Female							
	Group and dose		20 mg/kg			100 mg/kg				
	Number of animals		10			10				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Hematopoietic system										
Mesenteric lymph node			(10)					(10)		
Accumulation, foam cell	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1
Spleen			(0)					NR (10)		
Bone marrow (sternum)			(0)					NR (10)		
Bone marrow (femur)			(0)					NR (10)		
Cardiovascular system										
Heart										
Cellular infiltration, mononuclear cell			(0)			10	0	0	0	0
Fibrosis, myocardium						10	0	0	0	0
Aorta			(0)					NR (10)		
Urinary system										
Kidney										
Tubule, basophilic	10	0	0	0	0	8	2	0	0	2
Droplet, epithelial cell, proximal tubule, hyaline	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Cast, proteinaceous	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1
Cyst, medulla	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Cellular infiltration, mononuclear cell, pelvis	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Fibrosis, medulla	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Mineralization, cortex	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Mineralization, medulla	8	2	0	0	2	10	0	0	0	0
Urinary bladder			(0)					(10)		
Granuloma, adventitia						10	0	0	0	0
Genital system										
Testis			NA					NA		
Epididymis			NA					NA		
Prostate			NA					NA		
Cellular infiltration, mononuclear cell										
Seminal vesicle			NA					NA		
Ovary			(0)					NR (10)		
Uterus			(0)					NR (10)		

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

NA: not applicable.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 14 - continued      Histopathological findings  
Male, Female, 13w

Organs and findings	Sex	Female									
	Group and dose	20 mg/kg					100 mg/kg				
	Number of animals	10					10				
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Genital system											
Vagina				(0)					(10)		
Degeneration, epithelium, mucous						9	1	0	0	1	
Mammary gland				(0)					NR(10)		
Endocrine system											
Pituitary				(0)					(10)		
Cyst, anterior lobe						9	1	0	0	1	
Thyroid				(0)					(10)		
Remnant, ultimobranchial body						9	1	0	0	1	
Parathyroid				(0)					NR(10)		
Adrenal				(0)					(10)		
Hypertrophy, cortical cell, focal						10	0	0	0	0	
Nervous system											
Cerebrum				(0)					NR(10)		
Cerebellum				(0)					NR(10)		
Medulla oblongata				(0)					NR(10)		
Spinal cord				(0)					NR(10)		
Optic nerve				(0)					NR(10)		
Sciatic nerve				(0)					NR(10)		
Special sense organs											
Eye				(0)					(10)		
Dysplasia, retina						10	0	0	0	0	
Harderian gland				(0)					NR(10)		
Musculoskeletal system											
M. biceps femoris				(0)					NR(10)		
Sternum				(0)					NR(10)		
Femur				(0)					NR(10)		
Integumentary system											
Integument				(0)					NR(10)		

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 15 Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex		Male												
	Group and dose		Control				4 mg/kg				20 mg/kg				
	Number of animals		10				8				8				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
<b>Digestive system</b>															
Tongue					NR (10)					(0)					(0)
Esophagus					NR (10)					(0)					(0)
Stomach					(10)					(0)					(0)
Dilatation, glandular space, glandular stomach	5	5	0	0	5										
Duodenum					(10)					(0)					(8)
Accumulation, foam cell, lamina propria	10	0	0	0	0						8	0	0	0	0
Jejunum					(10)					(0)					(8)
Accumulation, foam cell, lamina propria	10	0	0	0	0						8	0	0	0	0
Ileum					(10)					(0)					(8)
Accumulation, foam cell, lamina propria	10	0	0	0	0						8	0	0	0	0
Accumulation, foam cell, peyer's patch	10	0	0	0	0						8	0	0	0	0
Cecum					NR (10)					(0)					(0)
Colon					NR (10)					(0)					(0)
Rectum					NR (10)					(0)					(0)
Submaxillary gland					NR (10)					(0)					(0)
Sublingual gland					NR (10)					(0)					(0)
Parotid gland					NR (10)					(0)					(0)
Liver					(10)					(8)					(8)
Degeneration, hepatocyte, fatty, centrilobular	9	1	0	0	1	7	1	0	0	1	8	0	0	0	0
Degeneration, hepatocyte, fatty, periportal	4	5	1	0	6	7	1	0	0	1*	4	3	1	0	4
Necrosis, hepatocyte, focal	10	0	0	0	0	5	2	1	0	3*	8	0	0	0	0
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Hyperplasia, bile duct	9	1	0	0	1	8	0	0	0	0	6	2	0	0	2
Hematopoiesis, extramedullary	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Focus, altered cell, basophilic	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Focus, altered cell, clear	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Angiectasis	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Hemorrhage	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Cellular infiltration, mononuclear cell	8	2	0	0	2	8	0	0	0	0	5	3	0	0	3
Accumulation, foam cell, sinusoid <sup>en</sup>	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	6	2	0	0	2
Cholangioma	9	1	0	0	1	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

a) with lymphocyte infiltration.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males in the 20 mg/kg group died.



Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex	Group and dose	Male														
			Control					4 mg/kg					20 mg/kg				
			10					8					8				
			-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
<b>Digestive system</b>																	
<b>Pancreas</b>																	
			(10)					(0)					(0)				
Atrophy, acinus, focal			10	0	0	0	0										
Hyperplasia, acinar cell, focal			8	2	0	0	2										
Focus, acinar cell, basophilic			8	2	0	0	2										
Metaplasia, hepatocyte			10	0	0	0	0										
Hemorrhage			9	1	0	0	1										
Polyarteritis			10	0	0	0	0										
<b>Respiratory system</b>																	
<b>Trachea</b>																	
			NR(10)					(0)					(0)				
<b>Lung</b>																	
			(10)					(0)					(0)				
Metaplasia, osseous			8	2	0	0	2										
Accumulation, foam cell, alveolus			9	1	0	0	1										
Mineralization, artery			6	4	0	0	4										
<b>Hematopoietic system</b>																	
<b>Thymus</b>																	
			(10)					(0)					(0)				
Atrophy			0	7	3	0	10										
<b>Submaxillary lymph node</b>																	
			NR(10)					(0)					(0)				
<b>Mesenteric lymph node</b>																	
			(10)					(8)					(8)				
Accumulation, foam cell			10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	3	5	0	0	5**
<b>Spleen</b>																	
			(10)					(8)					(8)				
Hematopoiesis, extramedullary			10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Cyst, capsule			10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Accumulation, foam cell, white pulp			10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	7	1	0	0	1
Accumulation, foam cell, red pulp			10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	7	1	0	0	1
<b>Bone marrow (sternum)</b>																	
			NR(10)					(0)					(0)				
<b>Bone marrow (femur)</b>																	
			NR(10)					(0)					(0)				
<b>Cardiovascular system</b>																	
<b>Heart</b>																	
			(10)					(0)					(0)				
Cellular infiltration, mononuclear cell			4	6	0	0	6										
Fibrosis, myocardium			5	5	0	0	5										

\*\* : P&lt;0.01 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males in the 20 mg/kg group died.

Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex		Male												
	Group and dose		Control				4 mg/kg				20 mg/kg				
	Number of animals		10				8				8				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Cardiovascular system															
Aorta					NR (10)					(0)					(0)
Urinary system															
Kidney					(10)					(8)					(8)
Hyperplasia, transitional epithelium, pelvis	9	1	0	0	1	6	2	0	0	2	8	0	0	0	0
Tubule, basophilic	5	4	1	0	5	3	4	1	0	5	3	5	0	0	5
Karyomegaly, epithelial cell, proximal tubule	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Droplet, epithelial cell, proximal tubule, hyaline	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Cast, proteinaceous	8	2	0	0	2	6	2	0	0	2	4	4	0	0	4
Dilatation, distal tubule	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Dilatation, pelvic cavity	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Cyst, medulla	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Hemorrhage, pelvis	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Cellular infiltration, mononuclear cell, pelvis	9	1	0	0	1	5	3	0	0	3	5	3	0	0	3
Cellular infiltration, mononuclear cell, cortex	9	1	0	0	1	6	2	0	0	2	7	1	0	0	1
Cellular exudation, pelvic cavity, neutrophil	9	1	0	0	1	6	2	0	0	2	5	3	0	0	3
Mineralization, pelvis	9	1	0	0	1	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Mineralization, cortex	10	0	0	0	0	7	1	0	0	1	4	4	0	0	4*
Mineralization, medulla	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0	7	1	0	0	1
Urinary bladder					NR (10)					(0)					(0)
Genital system															
Testis					(10)					(0)					(0)
Atrophy, seminiferous tubule	9	0	0	1	1										
Edema, interstitium	9	0	0	1	1										
Epididymis					(10)					(0)					(0)
Decrease, sperm, lumen	9	0	1	0	1										
Prostate					(10)					(0)					(0)
Cellular infiltration, mononuclear cell	9	1	0	0	1										
Fibrosis, interstitium	10	0	0	0	0										
Seminal vesicle					NR (10)					(0)					(0)
Ovary					NA					NA					NA

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

NA: not applicable.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males in the 20 mg/kg group died.

Table 15 - continued      Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex Group and dose Number of animals	Male														
		Control					4 mg/kg					20 mg/kg				
		10					8					8				
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
<b>Genital system</b>																
Uterus					NA					NA					NA	
Metaplasia, epithelial cell, gland, squamous																
Cyst, endometrium																
Vagina					NA					NA					NA	
Degeneration, epithelium, mucous																
Mammary gland					(10)					(0)					(0)	
Ectasia, alveolus/duct		10	0	0	0	0										
Adenoma		10	0	0	0	0										
<b>Endocrine system</b>																
Pituitary					(10)					(0)					(0)	
Hyperplasia, anterior lobe, focal		9	1	0	0	1										
Cyst, anterior lobe		10	0	0	0	0										
Hemorrhage, Rathke's pouch		10	0	0	0	0										
Gliosis, posterior lobe		9	1	0	0	1										
Ectopic tissue, posterior lobe		10	0	0	0	0										
Adenoma, anterior lobe		10	0	0	0	0										
Thyroid					(10)					(0)					(0)	
Hyperplasia, C cell, focal		9	1	0	0	1										
Remnant, ultimobranchial body		8	2	0	0	2										
Parathyroid					NR (10)					(0)					(0)	
Adrenal					(10)					(0)					(0)	
Hypertrophy, cortical cell, focal		9	1	0	0	1										
Hyperplasia, cortical cell, focal		10	0	0	0	0										
Angiectasis		10	0	0	0	0										
<b>Nervous system</b>																
Cerebrum					NR (10)					(0)					(0)	
Cerebellum					NR (10)					(0)					(0)	
Medulla oblongata					NR (10)					(0)					(0)	
Spinal cord					NR (10)					(0)					(0)	
Optic nerve					NR (10)					(0)					(0)	
Sciatic nerve					NR (10)					(0)					(0)	

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

NA: not applicable.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males in the 20 mg/kg group died.

Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex Group and dose Number of animals	Male														
		Control					4 mg/kg					20 mg/kg				
		10					8					8				
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Special sense organs																
Eye																
		(10)					(0)					(0)				
	Atrophy, retina, focal	10	0	0	0	0										
	Dysplasia, retina	10	0	0	0	0										
	Mineralization, cornea	10	0	0	0	0										
	Harderian gland	NR(10)					(0)					(0)				
Musculoskeletal system																
	M. biceps femoris	NR(10)					(0)					(0)				
	Sternum	NR(10)					(0)					(0)				
	Femur	NR(10)					(0)					(0)				
Integumentary system																
	Integument	(10)					(0)					(0)				
	Cellular infiltration, mononuclear cell, subcutis	10	0	0	0	0										
	Keratoacanthoma	9	1	0	0	1										
Others																
	Extremity	(4)					(0)					(0)				
	Formation, callus, hindlimb	4	0	0	0	0										
	Ulcer, hindlimb	0	4	0	0	4										

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males in the 20 mg/kg group died.

Table 15 - continued Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex		Male					Female									
	Group and dose		100 mg/kg					Control					4 mg/kg				
	Number of animals		10					10					10				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total		
Digestive system																	
Tongue					NR (10)					NR (10)					(0)		
Esophagus					NR (10)					NR (10)					(0)		
Stomach					(10)					(10)					(0)		
Dilatation, glandular space, glandular stomach	7	3	0	0	3	8	2	0	0	2							
Duodenum					(10)					(10)					(0)		
Accumulation, foam cell, lamina propria	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0					0		
Jejunum					(10)					(10)					(0)		
Accumulation, foam cell, lamina propria	2	8	0	0	8**	10	0	0	0	0					0		
Ileum					(10)					(10)					(0)		
Accumulation, foam cell, lamina propria	4	6	0	0	6**	10	0	0	0	0					0		
Accumulation, foam cell, peyer's patch	7	3	0	0	3	10	0	0	0	0					0		
Cecum					NR (10)					NR (10)					(0)		
Colon					NR (10)					NR (10)					(0)		
Rectum					NR (10)					NR (10)					(0)		
Submaxillary gland					NR (10)					NR (10)					(0)		
Sublingual gland					NR (10)					NR (10)					(0)		
Parotid gland					NR (10)					NR (10)					(0)		
Liver					(10)					(10)					(10)		
Degeneration, hepatocyte, fatty, centrilobular	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Degeneration, hepatocyte, fatty, periportal	5	3	2	0	5	7	3	0	0	3	9	1	0	0	1		
Necrosis, hepatocyte, focal	8	2	0	0	2	9	1	0	0	1	9	1	0	0	1		
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	8	2	0	0	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Hyperplasia, bile duct	3	5	2	0	7**	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0		
Hematopoiesis, extramedullary	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1		
Focus, altered cell, basophilic	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1	9	1	0	0	1		
Focus, altered cell, clear	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Angiectasis	9	1	0	0	1	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0		
Hemorrhage	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	8	2	0	0	2		
Cellular infiltration, mononuclear cell	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Accumulation, foam cell, sinusoid <sup>a)</sup>	0	2	8	0	10**	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Cholangioma	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		

\*\* : P&lt;0.01 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

a) with lymphocyte infiltration.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex		Male					Female									
	Group and dose		100 mg/kg					Control					4 mg/kg				
	Number of animals		10					10					10				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total		
<b>Digestive system</b>																	
Pancreas			(10)					(10)					(0)				
Atrophy, acinus, focal	9	1	0	0	1	7	3	0	0	3							
Hyperplasia, acinar cell, focal	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0							
Focus, acinar cell, basophilic	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0							
Metaplasia, hepatocyte	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0							
Hemorrhage	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0							
Polyarteritis	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1							
<b>Respiratory system</b>																	
Trachea			NR (10)					NR (10)					(0)				
Lung			(10)					(10)					(0)				
Metaplasia, osseous	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0							
Accumulation, foam cell, alveolus	8	2	0	0	2	9	1	0	0	1							
Mineralization, artery	8	2	0	0	2	10	0	0	0	0							
<b>Hematopoietic system</b>																	
Thymus			(10)					(10)					(0)				
Atrophy	0	6	4	0	10	1	8	1	0	9							
Submaxillary lymph node			NR (10)					NR (10)					(0)				
Mesenteric lymph node			(10)					(10)					(10)				
Accumulation, foam cell	0	3	6	1	10**	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Spleen			(10)					(10)					(10)				
Hematopoiesis, extramedullary	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	8	1	1	0	2		
Cyst, capsule	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0		
Accumulation, foam cell, white pulp	6	3	1	0	4*	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Accumulation, foam cell, red pulp	6	3	1	0	4*	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0		
Bone marrow (sternum)			NR (10)					NR (10)					(0)				
Bone marrow (femur)			NR (10)					NR (10)					(0)				
<b>Cardiovascular system</b>																	
Heart			(10)					(10)					(0)				
Cellular infiltration, mononuclear cell	5	5	0	0	5	9	1	0	0	1							
Fibrosis, myocardium	5	4	1	0	5	10	0	0	0	0							

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 15 - continued

Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex	Male					Female									
	Group and dose	100 mg/kg					Control					4 mg/kg				
	Number of animals	10					10					10				
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Cardiovascular system																
Aorta																
Urinary system																
Kidney																
Hyperplasia, transitional epithelium, pelvis	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1	8	2	0	0	2	
Tubule, basophilic	1	7	2	0	9	10	0	0	0	0	7	3	0	0	3	
Karyomegaly, epithelial cell, proximal tubule	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	
Droplet, epithelial cell, proximal tubule, hyaline	7	3	0	0	3	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	
Cast, proteinaceous	7	3	0	0	3	9	1	0	0	1	8	2	0	0	2	
Dilatation, distal tubule	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	
Dilatation, pelvic cavity	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0	
Cyst, medulla	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0	
Hemorrhage, pelvis	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	
Cellular infiltration, mononuclear cell, pelvis	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0	
Cellular infiltration, mononuclear cell, cortex	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	
Cellular exudation, pelvic cavity, neutrophil	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0	
Mineralization, pelvis	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	8	2	0	0	2	
Mineralization, cortex	8	2	0	0	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	
Mineralization, medulla	10	0	0	0	0	8	2	0	0	2	6	4	0	0	4	
Urinary bladder																
Genital system																
Testis																
Atrophy, seminiferous tubule	10	0	0	0	0											
Edema, interstitium	10	0	0	0	0											
Epididymis																
Decrease, sperm, lumen	10	0	0	0	0											
Prostate																
Cellular infiltration, mononuclear cell	9	1	0	0	1											
Fibrosis, interstitium	9	1	0	0	1											
Seminal vesicle																
Ovary																

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

NA: not applicable.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex		Male					Female									
	Group and dose		100 mg/kg					Control					4 mg/kg				
	Number of animals		10					10					10				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total		
Genital system																	
Uterus			NA					(10)					(0)				
Metaplasia, epithelial cell, gland, squamous						7	3	0	0	3							
Cyst, endometrium						10	0	0	0	0							
Vagina			NA					(10)					(0)				
Degeneration, epithelium, mucous						6	4	0	0	4							
Mammary gland			(10)					(10)					(0)				
Ectasia, alveolus/duct	9	1	0	0	1	2	2	6	0	8							
Adenoma	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0							
Endocrine system																	
Pituitary			(10)					(10)					(0)				
Hyperplasia, anterior lobe, focal	9	1	0	0	1	8	2	0	0	2							
Cyst, anterior lobe	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0							
Hemorrhage, Rathke's pouch	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1							
Giosis, posterior lobe	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0							
Ectopic tissue, posterior lobe	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0							
Adenoma, anterior lobe	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0							
Thyroid			(10)					(10)					(0)				
Hyperplasia, C cell, focal	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0							
Remnant, ultimobranchial body	10	0	0	0	0	8	2	0	0	2							
Parathyroid			NR (10)					NR (9)					(0)				
Adrenal			(10)					(10)					(0)				
Hypertrophy, cortical cell, focal	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0							
Hyperplasia, cortical cell, focal	9	1	0	0	1	4	6	0	0	6							
Angiectasis	10	0	0	0	0	3	7	0	0	7							
Nervous system																	
Cerebrum			NR (10)					NR (10)					(0)				
Cerebellum			NR (10)					NR (10)					(0)				
Medulla oblongata			NR (10)					NR (10)					(0)				
Spinal cord			NR (10)					NR (10)					(0)				
Optic nerve			NR (10)					NR (10)					(0)				
Sciatic nerve			NR (10)					NR (10)					(0)				

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

NA: not applicable.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.



Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex Group and dose Number of animals	Male					Female									
		100 mg/kg					Control					4 mg/kg				
		10					10					10				
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Special sense organs																
Eye																
Atrophy, retina, focal																
Dysplasia, retina																
Mineralization, cornea																
Harderian gland																
Musculoskeletal system																
M. biceps femoris																
Sternum																
Femur																
Integumentary system																
Integument																
Cellular infiltration, mononuclear cell, subcutis																
Keratoacanthoma																
Others																
Extremity																
Formation, callus, hindlimb																
Ulcer, hindlimb																

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex		Female							
	Group and dose		20 mg/kg			100 mg/kg				
	Number of animals		9			10				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Digestive system										
Tongue			(0)					NR (10)		
Esophagus			(0)					NR (10)		
Stomach			(0)					(10)		
Dilatation, glandular space, glandular stomach						7	3	0	0	3
Duodenum			(9)					(10)		
Accumulation, foam cell, lamina propria	9	0	0	0	0	9	1	0	0	1
Jejunum			(9)					(10)		
Accumulation, foam cell, lamina propria	9	0	0	0	0	4	6	0	0	6**
Ileum			(9)					(10)		
Accumulation, foam cell, lamina propria	9	0	0	0	0	9	1	0	0	1
Accumulation, foam cell, peyer's patch	9	0	0	0	0	9	1	0	0	1
Cecum			(0)					NR (10)		
Colon			(0)					NR (10)		
Rectum			(0)					NR (10)		
Submaxillary gland			(0)					NR (10)		
Sublingual gland			(0)					NR (10)		
Parotid gland			(0)					NR (10)		
Liver			(9)					(10)		
Degeneration, hepatocyte, fatty, centrilobular	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Degeneration, hepatocyte, fatty, periportal	7	2	0	0	2	3	3	4	0	7*
Necrosis, hepatocyte, focal	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	4	0	0	4*	0	0	10	0	10**
Hyperplasia, bile duct	7	2	0	0	2	9	1	0	0	1
Hematopoiesis, extramedullary	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Focus, altered cell, basophilic	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Focus, altered cell, clear	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Angiectasis	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Hemorrhage	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Cellular infiltration, mononuclear cell	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Accumulation, foam cell, sinusoid <sup>a)</sup>	8	1	0	0	1	1	7	2	0	9**
Cholangioma	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

a) with lymphocyte infiltration.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One female in the 20 mg/kg group died.

Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex	Female										
		Group and dose	20 mg/kg					100 mg/kg				
			Number of animals					10				
			-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
<b>Digestive system</b>												
Pancreas		(0)					(10)					
Atrophy, acinus, focal						10	0	0	0	0		
Hyperplasia, acinar cell, focal						10	0	0	0	0		
Focus, acinar cell, basophilic						10	0	0	0	0		
Metaplasia, hepatocyte						10	0	0	0	0		
Hemorrhage						10	0	0	0	0		
Polyarteritis						10	0	0	0	0		
<b>Respiratory system</b>												
Trachea		(0)					NR (10)					
Lung		(0)					(10)					
Metaplasia, osseous						10	0	0	0	0		
Accumulation, foam cell, alveolus						10	0	0	0	0		
Mineralization, artery						9	1	0	0	1		
<b>Hematopoietic system</b>												
Thymus		(0)					(10)					
Atrophy						0	8	2	0	10		
Submaxillary lymph node		(0)					NR (10)					
Mesenteric lymph node		(9)					(10)					
Accumulation, foam cell		6	3	0	0	3	0	4	6	0	10**	
Spleen		(9)					(10)					
Hematopoiesis, extramedullary		8	1	0	0	1	10	0	0	0	0	
Cyst, capsule		9	0	0	0	0	10	0	0	0	0	
Accumulation, foam cell, white pulp		9	0	0	0	0	6	4	0	0	4*	
Accumulation, foam cell, red pulp		9	0	0	0	0	6	4	0	0	4*	
Bone marrow (sternum)		(0)					NR (10)					
Bone marrow (femur)		(0)					NR (10)					
<b>Cardiovascular system</b>												
Heart		(0)					(10)					
Cellular infiltration, mononuclear cell						9	1	0	0	1		
Fibrosis, myocardium						10	0	0	0	0		

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One female in the 20 mg/kg group died.

Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex		Female							
	Group and dose		20 mg/kg			100 mg/kg				
	Number of animals		9			10				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Cardiovascular system										
Aorta			(0)					NR	(10)	
Urinary system										
Kidney			(9)					(10)		
Hyperplasia, transitional epithelium, pelvis	8	1	0	0	1	10	0	0	0	0
Tubule, basophilic	6	3	0	0	3	5	5	0	0	5*
Karyomegaly, epithelial cell, proximal tubule	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Droplet, epithelial cell, proximal tubule, hyaline	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Cast, proteinaceous	6	3	0	0	3	6	4	0	0	4
Dilatation, distal tubule	8	1	0	0	1	10	0	0	0	0
Dilatation, pelvic cavity	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Cyst, medulla	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Hemorrhage, pelvis	8	1	0	0	1	10	0	0	0	0
Cellular infiltration, mononuclear cell, pelvis	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Cellular infiltration, mononuclear cell, cortex	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Cellular exudation, pelvic cavity, neutrophil	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Mineralization, pelvis	7	2	0	0	2	10	0	0	0	0
Mineralization, cortex	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Mineralization, medulla	2	7	0	0	7*	6	4	0	0	4
Urinary bladder			(0)					NR	(10)	
Genital system										
Testis			NA					NA		
Atrophy, seminiferous tubule										
Edema, interstitium										
Epididymis			NA					NA		
Decrease, sperm, lumen										
Prostate			NA					NA		
Cellular infiltration, mononuclear cell										
Fibrosis, interstitium										
Seminal vesicle			NA					NA		
Ovary			(0)					NR	(10)	

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

NA: not applicable.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One female in the 20 mg/kg group died.

Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex	Female									
	Group and dose	20 mg/kg					100 mg/kg				
		Number of animals	9					10			
			-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++
Genital system											
Uterus				(0)					(10)		
Metaplasia, epithelial cell, gland, squamous						8	2	0	0	2	
Cyst, endometrium						9	1	0	0	1	
Vagina				(0)					(10)		
Degeneration, epithelium, mucous						9	1	0	0	1	
Mammary gland				(0)					(10)		
Ectasia, alveolus/duct						4	3	3	0	6	
Adenoma						9	1	0	0	1	
Endocrine system											
Pituitary				(0)					(10)		
Hyperplasia, anterior lobe, focal						10	0	0	0	0	
Cyst, anterior lobe						10	0	0	0	0	
Hemorrhage, Rathke's pouch						10	0	0	0	0	
Gliosis, posterior lobe						10	0	0	0	0	
Ectopic tissue, posterior lobe						9	1	0	0	1	
Adenoma, anterior lobe						10	0	0	0	0	
Thyroid				(0)					(10)		
Hyperplasia, C cell, focal						9	1	0	0	1	
Remnant, ultimobranchial body						7	3	0	0	3	
Parathyroid				(0)					NR (10)		
Adrenal				(0)					(10)		
Hypertrophy, cortical cell, focal						10	0	0	0	0	
Hyperplasia, cortical cell, focal						7	3	0	0	3	
Angiectasis						2	8	0	0	8	
Nervous system											
Cerebrum				(0)					NR (10)		
Cerebellum				(0)					NR (10)		
Medulla oblongata				(0)					NR (10)		
Spinal cord				(0)					NR (10)		
Optic nerve				(0)					NR (10)		
Sciatic nerve				(0)					NR (10)		

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One female in the 20 mg/kg group died.

Table 15 - continued  
Histopathological findings  
Male, Female, 52w

Organs and findings	Sex Group and dose Number of animals	Female									
		20 mg/kg					100 mg/kg				
		9					10				
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Special sense organs											
Eye											
Atrophy, retina, focal											
Dysplasia, retina											
Mineralization, cornea											
Harderian gland											
Musculoskeletal system											
M. biceps femoris											
Sternum											
Femur											
Integumentary system											
Integument											
Cellular infiltration, mononuclear cell, subcutis											
Keratoacanthoma											
Others											
Extremity											
Formation, callus, hindlimb											
Ulcer, hindlimb											

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild (existence of tumor); ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

One female in the 20 mg/kg group died.

Table 2 Body weights  
Male, Female

Sex	Group and dose	Body weight (g) on day													
		1	8	15	22	29	36	43	50	57	64	71	78	85	
Male	Control	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	212.9	276.8	333.8	378.3	426.4	465.9	495.0	526.4	548.1	566.7	585.6	601.7	615.6
		S.D.	±8.9	±14.2	±18.2	±22.3	±26.5	±29.5	±33.2	±39.4	±40.7	±42.5	±46.8	±49.7	±49.9
	4 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	211.7	273.4	325.9	367.7	412.5	449.1	475.6	504.5	524.0	542.1	559.0	574.5	590.4
		S.D.	±9.0	±14.9	±21.7	±27.1	±33.4	±40.2	±47.6	±53.3	±55.1	±57.9	±59.8	±61.3	±63.6
	20 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	211.2	277.0	333.4	376.8	421.3	458.5	487.3	514.8	537.1	557.7	576.2	596.2	610.6
		S.D.	±9.7	±17.4	±25.2	±29.8	±34.6	±40.0	±44.4	±47.7	±49.3	±52.9	±56.2	±59.9	±62.0
	100 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	210.4	281.7	342.1	389.9	439.0	478.1	506.9	536.8	560.2	580.3	601.8	620.5	630.5
		S.D.	±8.8	±15.4	±23.0	±28.7	±32.5	±36.9	±38.8	±43.4	±44.4	±46.8	±50.3	±52.6	±56.0
Female	Control	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
		Mean	157.2	186.0	215.5	233.2	252.7	263.2	277.1	286.1	294.5	304.1	309.2	316.3	321.0
		S.D.	±5.9	±8.8	±11.4	±13.7	±17.1	±17.3	±18.5	±20.5	±23.4	±23.2	±25.8	±26.3	±28.9
	4 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	157.3	186.3	215.4	233.8	250.0	263.3	274.2	283.4	290.7	300.3	305.4	311.1	315.8
		S.D.	±7.4	±10.5	±12.4	±12.3	±14.4	±15.4	±15.8	±14.8	±17.2	±17.3	±19.4	±19.6	±20.4
	20 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	156.7	186.7	217.4	233.2	251.7	264.7	274.9	284.5	291.8	301.4	309.3	315.5	319.5
		S.D.	±7.6	±9.8	±13.9	±14.9	±15.7	±15.9	±19.7	±20.0	±21.8	±22.7	±25.2	±25.0	±26.0
	100 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	156.8	189.1	218.6	237.0	254.3	266.4	279.6	289.2	296.8	303.9	309.9	317.3	321.3
		S.D.	±8.6	±10.9	±17.0	±17.6	±22.3	±21.3	±23.9	±25.4	±27.0	±27.1	±27.8	±29.7	±32.6

Not significantly different from control.

Table 2 - continued  
Body weights  
Male, Female

Sex	Group and dose	Body weight (g) on day												
		91	92	120	148	176	204	232	260	288	316	344	364	
Male	Control	N	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	624.3	615.4	659.2	692.9	729.8	752.6	779.8	814.6	839.3	849.8	866.0	876.1
		S.D.	±49.1	±51.1	±59.5	±65.2	±71.2	±73.5	±77.0	±88.4	±94.7	±101.8	±103.8	±107.7
	4 mg/kg	N	19	10	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8
		Mean	602.2	594.0	635.7	671.9	705.7	727.1	752.1	781.1	796.5	812.3	813.4	823.7
		S.D.	±66.3	±69.1	±70.0	±71.2	±80.3	±78.6	±79.7	±85.4	±88.5	±97.0	±81.8	±82.1
	20 mg/kg	N	20	10	10	10	10	9	9	8	8	8	8	8
		Mean	621.8	625.6	669.9	706.5	737.9	778.1	800.4	802.1	823.7	836.4	856.0	866.8
		S.D.	±65.7	±84.0	±96.1	±105.5	±110.8	±119.2	±126.9	±133.2	±135.2	±139.0	±140.4	±140.4
	100 mg/kg	N	19	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	643.5	635.1	680.7	716.2	750.1	786.7	816.0	844.0	866.0	880.2	901.2	907.3
		S.D.	±57.7	±72.6	±81.9	±86.8	±96.7	±107.9	±118.8	±130.9	±135.4	±139.1	±139.8	±136.5
Female	Control	N	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	323.7	314.2	326.3	338.8	353.8	367.5	385.0	399.1	414.8	428.6	441.0	449.6
		S.D.	±28.2	±30.5	±32.2	±33.4	±40.8	±49.4	±53.2	±56.2	±59.6	±69.4	±70.9	±78.0
	4 mg/kg	N	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	320.1	315.0	329.0	340.5	352.9	368.6	385.1	391.3	408.5	414.4	423.4	426.0
		S.D.	±20.5	±20.9	±21.5	±24.8	±25.9	±27.2	±28.4	±36.6	±42.9	±45.4	±48.4	±54.3
	20 mg/kg	N	20	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
		Mean	323.9	314.0	325.5	340.6	357.2	372.2	388.2	401.4	418.5	425.6	445.0	454.1
		S.D.	±27.7	±11.4	±9.2	±15.6	±17.1	±19.1	±23.2	±23.7	±26.5	±32.9	±33.7	±39.4
	100 mg/kg	N	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	326.8	329.1	346.0	358.2	374.6	388.2	408.5	421.7	439.3	453.5	467.4	471.0
		S.D.	±30.6	±34.7	±39.5	±48.0	±51.3	±56.3	±67.1	±69.0	±78.1	±84.0	±96.4	±94.1

Not significantly different from control.



Table 3 Food consumption  
Male, Female

Sex	Group and dose		Food consumption(g) on day												
			2	8	15	22	29	36	43	50	57	64	71	78	85
Male	Control	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	23.3	25.1	25.2	25.6	26.0	25.5	24.2	25.1	23.4	23.5	22.9	22.9	21.9
		S.D.	±1.6	±2.0	±2.7	±2.2	±2.5	±2.6	±2.0	±3.1	±2.4	±2.7	±3.1	±3.0	±2.4
	4 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	23.0	23.9	24.6	25.0	24.5	25.0	23.3	24.0	23.2	22.9	21.9	21.8	22.8
		S.D.	±1.6	±2.3	±3.1	±2.8	±3.8	±2.9	±2.8	±3.4	±3.1	±2.8	±3.2	±3.0	±4.0
	20 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	24.1	25.1	25.5	26.2	25.4	25.7	25.0	25.7	24.7	24.6	24.0	23.5	23.5
		S.D.	±2.6	±2.8	±3.0	±3.2	±3.4	±3.0	±3.3	±2.8	±3.1	±3.0	±3.4	±3.3	±3.2
	100 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	24.1	24.6	26.5	26.8	26.3	25.9	25.2	25.8	26.1*	24.5	24.7	24.6	23.8*
		S.D.	±1.7	±2.6	±2.8	±4.0	±3.4	±3.3	±2.4	±2.6	±3.2	±3.3	±3.9	±3.4	±6.2
Female	Control	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
		Mean	16.0	15.4	16.4	16.4	17.2	15.6	17.5	16.0	16.5	15.7	15.2	16.5	14.5
		S.D.	±1.7	±1.9	±2.3	±2.3	±2.1	±2.1	±2.1	±2.0	±2.7	±2.2	±2.2	±2.3	±2.3
	4 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	16.2	16.0	16.4	16.4	16.6	16.4	16.7	15.3	15.9	15.8	16.3	14.9	15.1
		S.D.	±1.5	±1.9	±2.3	±1.7	±3.0	±2.4	±3.0	±2.4	±2.7	±1.6	±2.3	±2.7	±2.5
	20 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	16.2	15.2	16.6	16.2	16.9	16.7	16.5	16.9	16.4	15.9	16.4	16.7	15.6
		S.D.	±2.2	±1.9	±2.3	±2.7	±3.0	±2.5	±2.5	±2.8	±3.0	±2.7	±2.8	±3.1	±3.1
	100 mg/kg	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Mean	16.5	15.7	16.9	16.9	18.3	16.6	17.2	17.1	17.5	15.5	16.1	17.3	15.7
		S.D.	±1.2	±1.3	±2.5	±2.7	±3.7	±2.7	±2.7	±2.4	±2.6	±2.4	±3.2	±2.9	±2.9

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

Table 3 - continued Food consumption  
Male, Female

Sex	Group and dose	Food consumption(g) on day												
		91	92	120	148	176	204	232	260	288	316	344	364	
Male	Control	N	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	22.8	21.7	22.0	21.4	20.3	18.6	18.8	20.1	16.9	17.6	18.6	17.3
		S.D.	±2.0	±1.4	±2.5	±1.8	±2.7	±2.2	±2.4	±2.4	±2.2	±1.6	±2.9	±1.9
	4 mg/kg	N	19	10	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8
		Mean	22.3	21.6	21.3	21.3	20.4	19.0	18.7	19.4	17.6	18.1	17.8	16.6
		S.D.	±3.3	±4.4	±3.6	±3.3	±4.2	±2.3	±3.0	±4.4	±3.9	±2.7	±1.6	±2.5
	20 mg/kg	N	20	10	10	10	10	9	9	8	8	8	8	8
		Mean	24.1	23.1	23.5	22.2	21.2	19.9	18.7	19.1	17.0	18.7	18.5	17.2
		S.D.	±3.7	±3.5	±3.3	±3.0	±2.4	±3.4	±3.9	±4.3	±4.0	±2.5	±2.8	±3.5
	100 mg/kg	N	19	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	24.9	21.8	23.4	23.1	22.1	20.5	19.5	19.6	19.9	19.9	19.1	17.3
		S.D.	±3.4	±3.3	±3.2	±3.3	±2.6	±4.1	±3.7	±3.6	±2.8	±3.5	±1.9	±1.9
Female	Control	N	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	15.8	14.9	14.7	15.5	15.5	13.7	13.7	14.3	15.4	16.1	12.9	13.0
		S.D.	±2.7	±1.2	±2.2	±1.6	±1.9	±2.8	±0.9	±1.5	±1.7	±2.6	±2.6	±2.6
	4 mg/kg	N	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	16.8	15.7	16.4	15.5	15.9	15.0	14.0	13.0	15.5	15.4	13.8	13.3
		S.D.	±2.5	±3.5	±2.4	±2.3	±2.6	±2.4	±2.5	±2.7	±2.0	±1.3	±1.7	±4.1
	20 mg/kg	N	20	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
		Mean	16.5	14.5	15.1	16.3	16.6	15.0	13.8	14.3	15.6	15.9	14.2	15.3
		S.D.	±2.8	±1.5	±1.9	±2.8	±2.4	±2.9	±3.2	±2.7	±2.5	±3.4	±2.6	±3.0
	100 mg/kg	N	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	17.3	15.9	15.8	17.0	18.0	15.6	15.4	14.3	16.4	15.4	15.0	15.1
		S.D.	±2.5	±1.7	±2.7	±2.4	±2.4	±2.5	±2.7	±2.7	±2.3	±3.8	±3.4	±2.6

Not significantly different from control.

Table 4 Urinary findings  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		Urine volume (mL/24hr)	Osmotic pressure (Osm/kg)	Specific gravity	Na (mEq/24hr)	K (mEq/24hr)	Cl (mEq/24hr)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	13.4	1.512	1.048	0.944	2.187	1.256
		S. D.	±5.1	±0.439	±0.015	±0.273	±0.502	±0.401
	4 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9
		Mean	17.6	1.452	1.048	0.852	2.145	1.250
		S. D.	±14.1	±0.596	±0.023	±0.416	±0.777	±0.595
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	15.4	1.506	1.047	0.988	2.433	1.422
		S. D.	±7.5	±0.433	±0.015	±0.297	±0.387	±0.387
	100 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9
		Mean	14.5	1.454	1.047	1.027	2.449	1.488
		S. D.	±4.7	±0.294	±0.009	±0.456	±0.440	±0.357
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	12.5	1.200	1.039	0.755	1.679	1.101
		S. D.	±7.6	±0.479	±0.017	±0.359	±0.490	±0.490
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	12.8	1.206	1.040	0.919	1.846	1.267
		S. D.	±7.1	±0.410	±0.014	±0.240	±0.507	±0.318
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	8.8	1.617	1.054	0.774	1.908	1.204
		S. D.	±3.3	±0.385	±0.013	±0.300	±0.463	±0.315
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	12.3	1.169	1.039	0.883	1.807	1.231
		S. D.	±5.3	±0.400	±0.014	±0.232	±0.368	±0.196

Not significantly different from control.

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 4 - continued

Urinary findings  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose	Number of animals	Color		pH						Protein			Glucose	Ketone body
			PY	Y	5.5	6.0	6.5	7.0	8.0	8.5	-	±	+	-	-
Male	Control	10	0	10	0	0	0	1	8	1	5	3	2	10	10
	4 mg/kg	9	1	8	0	0	0	1	6	2	2	4	3	9	9
	20 mg/kg	10	1	9	0	0	0	0	8	2	4	4	2	10	10
	100 mg/kg	9	0	9	0	0	0	2	5	2	0	5	4	9	9
Female	Control	10	1	9	0	2	0	4	3	1	8	2	0	10	10
	4 mg/kg	10	1	9	1	0	0	0	7	2	10	0	0	10	10
	20 mg/kg	10	0	10	0	0	1	0	8	1	9	1	0	10	10
	100 mg/kg	10	0	10	0	3	0	1	4	2	10	0	0	10	10

Not significantly different from control.

Abbreviation: PY, pale yellow; Y, yellow; YB, yellowish brown; B, brown.

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe; +++++, very severe.

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 4 - continued  
Urinary findings  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose	Number of animals	Urinary findings		
			Bilirubin	Occult blood	Urobilinogen (mg/dL)
			-	-	<1
Male	Control	10	10	10	10
	4 mg/kg	9	9	9	9
	20 mg/kg	10	10	10	10
	100 mg/kg	9	9	9	9
Female	Control	10	10	10	10
	4 mg/kg	10	10	10	10
	20 mg/kg	10	10	10	10
	100 mg/kg	10	10	10	10

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe; +++++, very severe.

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 4 - continued  
Urinary findings  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose	Number of animals	Urinary sediment					Crystals		
			Epithelial cells	Erythrocytes	Leukocytes	Casts	-	+	++	
			-	-	-	-	-	+	++	
Male	Control	10	10	10	10	10	9	1	0	
	4 mg/kg	9	9	9	9	9	7	2	0	
	20 mg/kg	10	10	10	10	10	8	2	0	
	100 mg/kg	9	9	9	9	9	8	0	1	
Female	Control	10	10	10	10	10	10	0	0	
	4 mg/kg	10	10	10	10	10	10	0	0	
	20 mg/kg	10	10	10	10	10	10	0	0	
	100 mg/kg	10	10	10	10	10	10	0	0	

Not significantly different from control.

Grade signs are as follows.

Epithelial cells: -, < 3/field; +, 3/field  $\leq$  and < 10/field; ++, 10/field  $\leq$  and < 20/field; +++,  $\geq$  20/field.

Erythrocytes: -, < 10/field; +, 10/field  $\leq$  and < 30/field; ++, 30/field  $\leq$  and < 100/field; +++, countless.

Leukocytes: -, < 3/field; +, 3/field  $\leq$  and < 20/field; ++, 20/field  $\leq$  and < 40/field; +++,  $\geq$  40/field.

Casts: -, none; +,  $\geq$  1/all field.

Crystals: -, < 10/field; +, 10/field  $\leq$  and < 20/field; ++, 20/field  $\leq$  and < 30/field; +++, countless.

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 5 Urinary findings  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		Urine volume (mL/24hr)	Osmotic pressure (Osm/kg)	Specific gravity	Na (mEq/24hr)	K (mEq/24hr)	Cl (mEq/24hr)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	8.7	1.714	1.058	0.506	1.594	0.684
		S.D.	±3.4	±0.415	±0.019	±0.203	±0.380	±0.309
	4 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8
		Mean	10.4	1.435	1.050	0.501	1.395	0.652
		S.D.	±5.7	±0.527	±0.019	±0.183	±0.232	±0.285
	20 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8
		Mean	11.3	1.388	1.048	0.611	1.583	0.834
		S.D.	±5.9	±0.446	±0.017	±0.457	±0.560	±0.569
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	13.0	1.275	1.044	0.701	1.648	0.832
		S.D.	±4.8	±0.259	±0.011	±0.356	±0.246	±0.365
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	14.2	0.992	1.034	0.844	1.831	1.134
		S.D.	±5.7	±0.280	±0.010	±0.254	±0.377	±0.301
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	15.1	1.046	1.037	0.891	1.930	1.193
		S.D.	±7.3	±0.469	±0.019	±0.281	±0.372	±0.388
	20 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9
		Mean	18.0	0.810	1.028	0.879	1.971	1.229
		S.D.	±5.7	±0.256	±0.009	±0.278	±0.410	±0.369
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	13.8	1.158	1.042	0.834	1.927	1.152
		S.D.	±7.1	±0.417	±0.017	±0.244	±0.416	±0.315

Not significantly different from control.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 5 - continued  
Urinary findings  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose	Number of animals	Color		pH								Protein					Glucose	
			PY	Y	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++	+++	-	
Male	Control	10	0	10	0	0	0	0	0	0	2	7	1	0	1	6	2	1	10
	4 mg/kg	8	0	8	0	0	0	0	0	0	3	4	1	0	1	5	1	1	8
	20 mg/kg	8	0	8	0	0	0	1	2	3	2	0*	0	0	3	4	1	8	
	100 mg/kg	10	0	10	0	0	0	0	5	1	4	0	0	2	1	5	2	10	
Female	Control	10	0	10	1	1	0	1	3	0	4	0	4	3	1	2	0	10	
	4 mg/kg	10	2	8	0	2	0	1	3	1	3	0	2	4	2	2	0	10	
	20 mg/kg	9	2	7	2	1	2	2	2	0	0	0	2	1	2	4	0	9	
	100 mg/kg	10	2	8	0	2	0	0	4	0	4	0	2	1	3	1	3	10	

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

Abbreviation: PY, pale yellow; Y, yellow; YB, yellowish brown; B, brown.

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe; +++++, very severe.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.



Table 5 -- continued  
Urinary findings  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose	Number of animals	Ketone body	Bilirubin	Occult blood	Urobilinogen (mg/dL)
			-	-	-	<1
Male	Control	10	10	10	10	10
	4 mg/kg	8	8	8	8	8
	20 mg/kg	8	8	8	8	8
	100 mg/kg	10	10	10	10	10
Female	Control	10	10	10	10	10
	4 mg/kg	10	10	10	10	10
	20 mg/kg	9	9	9	9	9
	100 mg/kg	10	10	10	10	10

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe; +++++, very severe.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 5 - continued  
Urinary findings  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose	Number of animals	Urinary sediment				
			Epithelial cells	Erythrocytes	Leukocytes	Casts	Crystals
			-	-	- + ++	-	-
Male	Control	10	10	10	9 1 0	10	10
	4 mg/kg	8	8	8	6 2 0	8	8
	20 mg/kg	8	8	8	6 2 0	8	8
	100 mg/kg	10	10	10	9 1 0	10	10
Female	Control	10	10	10	9 0 1	10	10
	4 mg/kg	10	10	10	10 0 0	10	10
	20 mg/kg	9	9	9	9 0 0	9	9
	100 mg/kg	10	10	10	10 0 0	10	10

Not significantly different from control.

Grade signs are as follows.

Epithelial cells: -, < 3/field; +, 3/field  $\leq$  and < 10/field; ++, 10/field  $\leq$  and < 20/field; +++,  $\geq$  20/field.  
 Erythrocytes : -, < 10/field; +, 10/field  $\leq$  and < 30/field; ++, 30/field  $\leq$  and < 100/field; +++, countless.  
 Leukocytes : -, < 3/field; +, 3/field  $\leq$  and < 20/field; ++, 20/field  $\leq$  and < 40/field; +++,  $\geq$  40/field.  
 Casts : -, none; +,  $\geq$  1/all field.  
 Crystals : -, < 10/field; +, 10/field  $\leq$  and < 20/field; ++, 20/field  $\leq$  and < 30/field; +++, countless.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.  
 Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 6 Hematological findings  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		Leukocytes (10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)	Erythrocytes (10 <sup>4</sup> / $\mu$ L)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Reticulocyte (10 <sup>4</sup> / $\mu$ L)	Platelets (10 <sup>4</sup> / $\mu$ L)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	10.08	853	14.5	42.8	50.1	17.0	34.0	17.7	112.6
		S.D.	$\pm 3.06$	$\pm 35$	$\pm 0.6$	$\pm 1.9$	$\pm 0.6$	$\pm 0.2$	$\pm 0.5$	$\pm 2.3$	$\pm 15.8$
	4 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	9.09	863	14.6	42.8	49.7	16.9	34.0	17.6	109.0
		S.D.	$\pm 2.08$	$\pm 33$	$\pm 0.4$	$\pm 1.3$	$\pm 1.2$	$\pm 0.7$	$\pm 0.7$	$\pm 2.5$	$\pm 12.4$
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	10.35	846	14.5	42.1	49.9	17.2	34.4	19.5	113.6
		S.D.	$\pm 1.88$	$\pm 32$	$\pm 0.6$	$\pm 1.8$	$\pm 1.5$	$\pm 0.5$	$\pm 0.7$	$\pm 3.2$	$\pm 10.9$
	100 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	9.28	857	14.4	42.0	49.1	16.8	34.2	18.0	111.6
		S.D.	$\pm 2.21$	$\pm 38$	$\pm 0.3$	$\pm 1.1$	$\pm 1.7$	$\pm 0.7$	$\pm 0.5$	$\pm 2.4$	$\pm 11.3$
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	4.61	789	14.1	40.3	51.1	17.9	35.0	14.5	115.1
		S.D.	$\pm 1.47$	$\pm 48$	$\pm 0.5$	$\pm 1.7$	$\pm 1.7$	$\pm 0.7$	$\pm 0.5$	$\pm 4.1$	$\pm 13.9$
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	4.65	784	14.1	40.0	51.1	18.0	35.2	13.3	119.8
		S.D.	$\pm 1.08$	$\pm 37$	$\pm 0.3$	$\pm 0.8$	$\pm 1.8$	$\pm 0.7$	$\pm 0.4$	$\pm 2.2$	$\pm 11.4$
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	5.84	772	13.7	39.4	51.1	17.8	34.8	15.5	115.3
		S.D.	$\pm 0.67$	$\pm 40$	$\pm 0.6$	$\pm 1.6$	$\pm 1.4$	$\pm 0.5$	$\pm 0.5$	$\pm 2.8$	$\pm 14.5$
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	5.53	778	13.9	39.1	50.3	17.9	35.5	14.6	120.1
		S.D.	$\pm 1.57$	$\pm 28$	$\pm 0.6$	$\pm 1.5$	$\pm 1.4$	$\pm 0.6$	$\pm 0.7$	$\pm 2.5$	$\pm 13.1$

Not significantly different from control.

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 6 - continued  
Hematological findings  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		PT (sec)	APTT (sec)
Male	Control	N	10	10
		Mean	13.8	22.7
		S.D.	±1.3	±1.9
	4 mg/kg	N	9	9
		Mean	15.2	24.6
		S.D.	±2.3	±2.6
	20 mg/kg	N	10	10
		Mean	14.4	22.5
		S.D.	±1.3	±2.0
	100 mg/kg	N	9	9
		Mean	14.7	24.4
		S.D.	±0.7	±2.3
Female	Control	N	10	10
		Mean	12.7	19.1
		S.D.	±0.6	±0.7
	4 mg/kg	N	10	10
		Mean	12.5	19.3
		S.D.	±0.6	±1.1
	20 mg/kg	N	10	10
		Mean	12.5	19.5
		S.D.	±0.4	±0.8
	100 mg/kg	N	10	10
		Mean	12.4	20.1
		S.D.	±0.5	±1.3

Not significantly different from control.

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 6 - continued Hematological findings  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		Differential leukocyte count					
			Eosinophils	Neutrophils	Lymphocytes	Basophils	Monocytes	Large unstained cells
			(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)	(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)	(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)	(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)	(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)	(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.4	18.6	77.9	0.3	1.8	0.8
		S. D.	$\pm 0.5$	$\pm 8.1$	$\pm 29.8$	$\pm 0.2$	$\pm 0.8$	$\pm 0.6$
	4 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9
		Mean	1.9	15.9	70.5	0.2	1.6	0.8
		S. D.	$\pm 0.4$	$\pm 5.9$	$\pm 18.3$	$\pm 0.1$	$\pm 0.5$	$\pm 0.6$
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.5	20.6	78.3	0.3	2.0	0.9
		S. D.	$\pm 0.6$	$\pm 9.5$	$\pm 13.9$	$\pm 0.1$	$\pm 0.7$	$\pm 0.4$
	100 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9
		Mean	1.7	18.8	69.5	0.3	1.7	0.8
		S. D.	$\pm 0.5$	$\pm 5.1$	$\pm 19.3$	$\pm 0.2$	$\pm 0.5$	$\pm 0.4$
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.8	5.7	38.6	0.1	0.7	0.3
		S. D.	$\pm 0.3$	$\pm 1.4$	$\pm 13.2$	$\pm 0.1$	$\pm 0.3$	$\pm 0.2$
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.7	6.1	38.4	0.1	0.7	0.4
		S. D.	$\pm 0.2$	$\pm 2.7$	$\pm 9.0$	$\pm 0.0$	$\pm 0.2$	$\pm 0.3$
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.7	6.5	49.7	0.1	0.8	0.5
		S. D.	$\pm 0.2$	$\pm 2.3$	$\pm 6.5$	$\pm 0.0$	$\pm 0.4$	$\pm 0.2$
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.9	6.0	47.0	0.1	0.8	0.6*
		S. D.	$\pm 0.3$	$\pm 1.5$	$\pm 15.1$	$\pm 0.1$	$\pm 0.4$	$\pm 0.3$

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 7 Hematological findings  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		Leukocytes ( $10^3 / \mu\text{L}$ )	Erythrocytes ( $10^4 / \mu\text{L}$ )	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Reticulocyte ( $10^4 / \mu\text{L}$ )	Platelets ( $10^4 / \mu\text{L}$ )	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	7.21	840	14.0	45.0	53.6	16.7	31.2	15.6	103.4	
		S.D.	$\pm 1.47$	$\pm 47$	$\pm 0.9$	$\pm 2.9$	$\pm 2.2$	$\pm 0.6$	$\pm 0.5$	$\pm 3.9$	$\pm 8.3$	
	4 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	7.42	843	14.2	45.2	53.7	16.8	31.4	16.1	103.4	
		S.D.	$\pm 1.08$	$\pm 67$	$\pm 1.1$	$\pm 3.0$	$\pm 2.3$	$\pm 0.6$	$\pm 0.5$	$\pm 4.2$	$\pm 14.2$	
	20 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	7.51	843	13.6	43.6	51.6	16.1	31.2	17.5	113.3	
		S.D.	$\pm 2.15$	$\pm 91$	$\pm 2.3$	$\pm 6.1$	$\pm 3.9$	$\pm 1.8$	$\pm 1.4$	$\pm 10.1$	$\pm 33.6$	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	11.94**	881	13.4	43.1	48.9**	15.2*	31.0	17.6	110.5	
		S.D.	$\pm 2.51$	$\pm 45$	$\pm 0.8$	$\pm 2.3$	$\pm 3.0$	$\pm 1.0$	$\pm 0.6$	$\pm 2.5$	$\pm 10.5$	
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	4.75	747	13.9	41.8	56.0	18.6	33.2	14.4	98.8	
		S.D.	$\pm 0.80$	$\pm 39$	$\pm 0.5$	$\pm 1.7$	$\pm 2.6$	$\pm 0.7$	$\pm 1.0$	$\pm 3.7$	$\pm 15.1$	
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	7.10	657	12.2	37.3*	57.2	18.7	32.7	17.6	97.3	
		S.D.	$\pm 6.88$	$\pm 117$	$\pm 2.0$	$\pm 5.2$	$\pm 3.6$	$\pm 0.5$	$\pm 1.3$	$\pm 9.2$	$\pm 23.9$	
	20 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	4.24	676	12.7*	38.6	57.5	18.9	32.9	20.9	109.1	
		S.D.	$\pm 1.17$	$\pm 99$	$\pm 1.6$	$\pm 4.1$	$\pm 4.3$	$\pm 1.0$	$\pm 0.9$	$\pm 18.6$	$\pm 23.7$	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	5.33	693	12.4**	37.7*	54.5	18.0	33.0	13.7	105.3	
		S.D.	$\pm 1.78$	$\pm 61$	$\pm 0.9$	$\pm 3.2$	$\pm 3.4$	$\pm 1.2$	$\pm 0.5$	$\pm 5.2$	$\pm 10.9$	

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  (significantly different from control).One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.  
Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 7 - continued  
Hematological findings  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		PT (sec)	APTT (sec)
Male	Control	N	10	10
		Mean	14.2	22.1
		S.D.	±1.2	±1.3
	4 mg/kg	N	8	8
		Mean	14.8	21.7
		S.D.	±1.4	±2.1
	20 mg/kg	N	8	8
		Mean	14.2	21.9
		S.D.	±1.4	±1.5
	100 mg/kg	N	10	10
		Mean	19.0**	25.5**
		S.D.	±3.0	±2.1
Female	Control	N	10	10
		Mean	12.6	18.1
		S.D.	±0.6	±1.9
	4 mg/kg	N	10	10
		Mean	12.0	17.7
		S.D.	±1.3	±1.9
	20 mg/kg	N	9	9
		Mean	12.2	18.2
		S.D.	±0.4	±0.8
	100 mg/kg	N	10	10
		Mean	11.6*	17.9
		S.D.	±0.7	±1.6

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 7 - continued  
Hematological findings  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		Differential leukocyte count					
			Eosinophils	Neutrophils	Lymphocytes	Basophils	Monocytes	Large unstained cells
			(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)	(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)	(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)	(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)	(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)	(10 <sup>2</sup> / $\mu$ L)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.3	22.6	44.8	0.1	2.7	0.7
		S.D.	$\pm 0.2$	$\pm 10.3$	$\pm 7.3$	$\pm 0.0$	$\pm 0.9$	$\pm 0.3$
	4 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8
		Mean	1.2	21.3	48.4	0.1	2.2	0.9
		S.D.	$\pm 0.3$	$\pm 8.2$	$\pm 8.5$	$\pm 0.1$	$\pm 0.4$	$\pm 0.3$
	20 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8
		Mean	1.1	25.5	44.9	0.1	2.6	0.9
		S.D.	$\pm 0.5$	$\pm 14.5$	$\pm 16.1$	$\pm 0.1$	$\pm 0.6$	$\pm 0.6$
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.4	41.8**	70.6**	0.2*	4.1**	1.5**
		S.D.	$\pm 0.5$	$\pm 12.1$	$\pm 19.9$	$\pm 0.1$	$\pm 0.7$	$\pm 0.4$
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.8	14.8	29.9	0.1	1.6	0.4
		S.D.	$\pm 0.2$	$\pm 5.5$	$\pm 6.0$	$\pm 0.1$	$\pm 0.5$	$\pm 0.2$
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.8	32.3	33.6	0.1	2.7	1.6
		S.D.	$\pm 0.3$	$\pm 44.1$	$\pm 20.1$	$\pm 0.2$	$\pm 2.5$	$\pm 3.0$
	20 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9
		Mean	0.8	13.3	26.2	0.0	1.7	0.5
		S.D.	$\pm 0.3$	$\pm 5.1$	$\pm 8.5$	$\pm 0.0$	$\pm 0.5$	$\pm 0.1$
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.7	13.5	36.0	0.1	2.1	0.9
		S.D.	$\pm 0.3$	$\pm 7.3$	$\pm 12.6$	$\pm 0.1$	$\pm 0.8$	$\pm 0.8$

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.



Table 8 Biochemical findings  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		T. Protein (g/dL)	A/G ratio	$\alpha_1$ -Globulin (%)	$\alpha_2$ -Globulin (%)	$\beta$ -Globulin (%)	$\gamma$ -Globulin (%)	Albumin (%)	T. Bilirubin (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	5.7	1.20	18.2	7.8	15.0	4.5	54.6	0.0	95	33	
		S.D.	±0.3	±0.08	±1.6	±0.6	±0.8	±0.6	±1.6	±0.0	±26	±25	
	4 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	5.6	1.17	18.6	7.9	15.1	4.6	53.9	0.0	94	35	
		S.D.	±0.3	±0.06	±1.2	±0.5	±0.8	±0.8	±1.2	±0.0	±44	±31	
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	5.7	1.20	17.2	7.8	15.7	5.0	54.4	0.0	88	29	
		S.D.	±0.3	±0.13	±2.2	±0.4	±1.2	±1.3	±2.7	±0.0	±33	±30	
	100 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	5.8	1.15	17.2	8.4	16.8**	4.0	53.5	0.0	74	26	
		S.D.	±0.3	±0.07	±1.4	±0.8	±1.0	±1.1	±1.5	±0.0	±7	±5	
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	6.3	1.74	14.0	5.8	12.0	4.8	63.5	0.1	78	24	
		S.D.	±0.3	±0.14	±1.2	±0.4	±0.9	±0.8	±1.9	±0.1	±14	±6	
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	6.4	1.73	13.9	6.0	12.2	4.6	63.3	0.0	90	22	
		S.D.	±0.3	±0.13	±0.5	±0.5	±0.5	±0.8	±1.9	±0.0	±17	±9	
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	6.5	1.78	13.6	5.7	12.5	4.3	63.9	0.0	105	32	
		S.D.	±0.2	±0.17	±1.8	±0.5	±0.9	±1.0	±2.3	±0.0	±69	±40	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	6.4	1.51**	14.7	6.4	13.9**	4.8	60.2**	0.0*	73	18	
		S.D.	±0.3	±0.07	±2.0	±0.7	±0.6	±0.9	±1.1	±0.0	±20	±3	

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 8 - continued  
Biochemical findings  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		ALP (IU/L)	T.Cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Phospholipids (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	197	73	60	123	132	12.5	0.5	6.2	10.1	145.4	
		S.D.	±49	±16	±30	±23	±21	±1.1	±0.1	±0.5	±0.3	±0.8	
	4 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	208	79	45	128	124	12.6	0.4	6.1	10.2	145.3	
		S.D.	±26	±25	±16	±34	±13	±1.9	±0.1	±0.6	±0.5	±0.7	
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	167	75	49	124	129	13.2	0.5	6.3	10.2	145.7	
		S.D.	±28	±10	±22	±14	±14	±1.0	±0.1	±0.6	±0.4	±1.1	
	100 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	167	79	47	129	132	12.7	0.4	6.3	10.4	145.3	
		S.D.	±40	±9	±19	±16	±15	±1.7	±0.1	±0.5	±0.3	±0.6	
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	99	79	30	154	120	16.1	0.5	4.9	10.5	143.3	
		S.D.	±20	±13	±13	±23	±12	±3.0	±0.1	±1.2	±0.2	±0.8	
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	85	82	24	154	118	16.6	0.5	5.3	10.7	142.8	
		S.D.	±21	±16	±8	±25	±13	±2.6	±0.0	±0.9	±0.3	±0.8	
	20 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	89	93*	22	172	123	15.1	0.5	5.4	10.8	142.9	
		S.D.	±32	±5	±11	±10	±8	±2.6	±0.1	±0.8	±0.3	±0.8	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	88	99*	25	172	118	16.8	0.5	5.3	10.6	142.9	
		S.D.	±27	±12	±22	±19	±9	±3.5	±0.0	±1.1	±0.4	±0.8	

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 8 - continued  
Biochemical findings  
Male, Female, 13w

Sex	Group and dose		K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
Male	Control	N	10	10
		Mean	4.40	104.5
		S.D.	±0.21	±1.1
	4 mg/kg	N	9	9
		Mean	4.29	104.1
		S.D.	±0.28	±2.0
	20 mg/kg	N	10	10
		Mean	4.38	104.3
		S.D.	±0.20	±1.1
	100 mg/kg	N	9	9
		Mean	4.49	102.6*
		S.D.	±0.16	±1.3
Female	Control	N	10	10
		Mean	4.01	105.3
		S.D.	±0.30	±0.8
	4 mg/kg	N	10	10
		Mean	4.02	104.6
		S.D.	±0.23	±1.3
	20 mg/kg	N	10	10
		Mean	4.02	104.7
		S.D.	±0.18	±0.8
	100 mg/kg	N	10	10
		Mean	4.05	104.2
		S.D.	±0.32	±1.9

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund and one male in the 100 mg/kg group died.

Table 9 Biochemical findings  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		T.Protein (g/dL)	A/G ratio	$\alpha_1$ -Globulin (%)	$\alpha_2$ -Globulin (%)	$\beta$ -Globulin (%)	$\gamma$ -Globulin (%)	Albumin (%)	T.Bilirubin (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	6.1	1.00	19.6	7.7	17.1	5.8	49.8	0.0	90	37	
		S.D.	±0.3	±0.12	±2.7	±1.2	±1.9	±1.3	±3.1	±0.0	±14	±23	
	4 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	6.1	0.98	19.9	7.7	17.4	5.6	49.4	0.0	89	59	
		S.D.	±0.2	±0.15	±2.1	±0.9	±2.2	±1.6	±3.8	±0.0	±45	±64	
	20 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	6.2	0.92	18.6	8.1	18.9	7.2	47.2	0.0	93	38	
		S.D.	±0.4	±0.25	±2.3	±1.4	±4.1	±1.8	±6.7	±0.0	±25	±15	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	6.0	0.79**	18.7	9.2*	22.3**	5.8	44.1**	0.0	101	59*	
		S.D.	±0.4	±0.06	±1.7	±1.1	±1.9	±0.9	±2.1	±0.0	±34	±24	
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	6.7	1.49	14.4	5.5	14.6	5.9	59.7	0.1	113	45	
		S.D.	±0.3	±0.16	±1.3	±0.9	±1.5	±0.9	±2.6	±0.1	±69	±56	
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	6.8	1.43	14.4	6.2	14.9	6.0	58.6	0.0	104	32	
		S.D.	±0.2	±0.20	±1.2	±2.3	±2.0	±1.3	±3.6	±0.0	±44	±21	
	20 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	6.9	1.42	14.9	5.6	15.1	5.9	58.5	0.1	86	32	
		S.D.	±0.4	±0.18	±1.5	±0.7	±1.7	±1.0	±3.3	±0.1	±29	±17	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	7.1*	1.21**	16.5*	5.8	17.3**	5.8	54.5**	0.0	82	31	
		S.D.	±0.4	±0.14	±2.3	±0.6	±2.1	±0.9	±2.9	±0.0	±14	±11	

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 9 - continued  
Biochemical findings  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		ALP (IU/L)	T.Cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Phospholipids (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	171	85	97	148	121	9.9	0.4	4.9	10.3	146.0	
		S.D.	±51	±11	±37	±21	±17	±1.5	±0.1	±0.4	±0.3	±0.7	
	4 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	150	94	95	157	123	8.7	0.4	4.7	10.0	146.1	
		S.D.	±47	±25	±50	±32	±13	±1.1	±0.1	±0.4	±0.3	±0.8	
	20 mg/kg	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Mean	142	89	93	153	116	9.3	0.4	4.9	10.1	145.6	
		S.D.	±57	±21	±66	±45	±20	±1.7	±0.1	±0.4	±0.3	±0.9	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	172	76	65	125	128	9.7	0.4	5.1	10.2	146.0	
		S.D.	±63	±15	±30	±20	±19	±1.6	±0.1	±0.9	±0.4	±0.8	
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	62	99	52	190	114	13.0	0.5	4.8	10.5	145.4	
		S.D.	±24	±16	±30	±30	±11	±2.1	±0.0	±0.9	±0.4	±0.6	
	4 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	117	106	56	197	105	14.0	0.5	4.7	11.1	145.9	
		S.D.	±235	±11	±26	±20	±15	±4.0	±0.1	±0.5	±1.1	±2.9	
	20 mg/kg	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mean	60	112	73	212	114	12.8	0.5	4.6	10.9	144.9	
		S.D.	±23	±20	±33	±34	±13	±1.3	±0.1	±0.5	±0.2	±0.6	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	59	131**	90	228*	116	11.4	0.4	4.8	10.9	144.1**	
		S.D.	±27	±21	±80	±33	±10	±2.8	±0.1	±0.4	±0.3	±0.6	

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control).

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 9 - continued  
Biochemical findings  
Male, Female, 52w

Sex	Group and dose		K	Cl
			(mEq/L)	(mEq/L)
Male	Control	N	10	10
		Mean	4.37	105.2
		S.D.	±0.17	±1.6
	4 mg/kg	N	8	8
		Mean	4.30	105.4
		S.D.	±0.16	±1.4
	20 mg/kg	N	8	8
		Mean	4.42	105.7
		S.D.	±0.37	±1.4
	100 mg/kg	N	10	10
		Mean	4.19	104.8
		S.D.	±0.18	±1.4
Female	Control	N	10	10
		Mean	3.91	105.4
		S.D.	±0.29	±2.8
	4 mg/kg	N	10	10
		Mean	3.96	106.5
		S.D.	±0.30	±3.3
	20 mg/kg	N	9	9
		Mean	3.98	105.0
		S.D.	±0.18	±1.4
	100 mg/kg	N	10	10
		Mean	3.99	104.5
		S.D.	±0.27	±1.9

Not significantly different from control.

One male in the 4 mg/kg group died and one male in the 4 mg/kg group was imminently sacrificed when moribund.

Two males and one female in the 20 mg/kg group died.

Table 1 Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Male	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		20 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	No abnormality		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Dead		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Swelling of limbs	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled perinaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
Male	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reddish urine		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
20 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled perinearis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	



Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
Male	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Swelling of limbs		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled perinearis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
Male	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	19	19
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	19
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
20 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	19	19	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	Soiled perinaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
Male	Control	Number of examined	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	19	19	19	19	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Dyscoria	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4 mg/kg	Number of examined	19	19	19	19	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		No abnormality	19	19	19	19	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			20 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormality	20			20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Dead	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Corn	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100 mg/kg	Number of examined	19	19	19	19	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	19	19	19	19	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled perianaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		No abnormality	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			20 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormality	10			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Dead	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corn	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled perinaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																						
			132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	4 mg/kg	4 mg/kg	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
			No abnormality	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8
			Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Shuffling gait			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Reddish urine			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hypothermia			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pale skin			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1			
20 mg/kg	20 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
100 mg/kg	100 mg/kg	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
100 mg/kg	100 mg/kg	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Soiled perianis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
100 mg/kg	100 mg/kg	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Shuffling gait		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Reddish urine		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hypothermia		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pale skin		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Corn		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
20 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled perinaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																						
			176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Corn	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Corn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		20 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
			No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
			Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corn	0		0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Swelling of limbs	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Soiled perinaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																				
			198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4 mg/kg		Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		20 mg/kg		Number of examined	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
No abnormality	9			9	9	9	8	8	8	8	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Dead	0			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Corn	1			1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Swelling of limbs	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 mg/kg		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Soiled perinearis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			



Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Corn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
20 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
	No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Corn	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled perianis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued

Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4 mg/kg		Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	7	7	7	7	7
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
		20 mg/kg		Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8
No abnormality	5			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Dead	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Corn	4			4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	
Swelling of limbs	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 mg/kg		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled perinaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

Table 1 - continued

Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																							
			264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285		
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Corn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
		No abnormality	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Corn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		20 mg/kg	Number of examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
			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
			Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corn	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
Swelling of limbs	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8	8	8	8	8		
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Soiled perinaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2		

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																						
			286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Corn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	4 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Corn	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		20 mg/kg	Number of examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
			No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corn	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
Swelling of limbs	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Soiled perinaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Corn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																						
			308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7		
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Corn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	4 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Corn	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		20 mg/kg	Number of examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
			No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corn	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
Swelling of limbs	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	No abnormality	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7		
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Soiled perinaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Corn	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		

Table 1 - continued

Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																							
			330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351		
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6		
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Corn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	
		Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	4 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5	5	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Corn	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3	
		20 mg/kg	Number of examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
			No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5
			Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corn	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3		
Swelling of limbs	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	No abnormality	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7		
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Soiled perianaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Corn	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3		

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days												
			352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	6	5	5	5	5	4	4	4	5	5	5	5	5
		Dyscoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Corn	3	4	4	4	4	5	5	5	4	4	4	4	4
		Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4 mg/kg	Number of examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		No abnormality	5	4	4	4	4	4	4	4	4	6	6	6	6
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Imminently sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Shuffling gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reddish urine		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hypothermia		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Corn	3	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2	2	2		
20 mg/kg	Number of examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
	No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Corn	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	
	Swelling of limbs	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	7	7	7	7	7	5	5	5	6	6	6	6	6	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled lower abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Soiled perianis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Corn	3	3	3	3	3	5	5	5	4	4	4	4	4	

Table 1 - continued

Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Female	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		



Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
Female	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	20 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
100 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
Female	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																				
			66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
Female	Control	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
No abnormality		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mass		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Abdominal respiration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
	No abnormality	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
100 mg/kg	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued

Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																				
			88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
Female	Control	Number of examined	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormality		20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mass		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	20	20	20	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued

Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																						
			110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormality		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mass		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																				
			132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Abdominal respiration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormality		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Swelling of limbs		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Abdominal respiration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormality		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mass		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Swelling of limbs		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued

Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	



Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																						
			198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormality		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mass		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued

Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	8
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormality		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mass		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																				
			264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Corn Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Corn Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Corn Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Dead		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued

Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8
		Corn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Corn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
Piloerection		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
100 mg/kg	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9
		Corn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Corn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	20 mg/kg	Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
No abnormality		9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	
Corn		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
Mass		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																					
			330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8
		Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	7
		Corn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
		Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Pale skin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Pale eyes	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	20 mg/kg	Hypoactivity	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Corn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Mass	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypoactivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	
	Corn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Swelling of limbs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued  
Clinical signs  
Male, Female

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days												
			352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	7	7
		Corn-Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
	4 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		No abnormality	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Corn-Mass	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		Pale skin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Pale eyes	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Hypoactivity	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	20 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		No abnormality	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	7	7
		Corn-Mass	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Abdominal respiration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dead		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	No abnormality	8	8	8	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	
	Corn-Mass	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	
	Swelling of limbs	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	