

5-エチリデン-2-ノルボルネ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 5-Ethylidene-2-norbornene in Rats

要約

5-エチリデン-2-ノルボルネンの0(トウモロコシ油), 4, 20および100 mg/kgを1群あたり雌雄各7あるいは14匹のCrj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し, さらに0および100 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。その結果, 以下の成績を得た。

100 mg/kg群の雄1例を投与9日に衰弱のため屠殺し, 盲腸の炎症などが認められたが, 5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連は明らかにならなかった。また, 同群の雄1例が投与25日の投与前に死亡し, 5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による死亡が疑われた。体重推移では, 雌雄の100 mg/kg群で体重増加量および増加率の低値が認められた。尿検査では, 雄の100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加および尿検査時の飲水量の低値が, 雌の100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加傾向が認められた。血液生化学検査では, 雄の20および100 mg/kg群ならびに雌の100 mg/kg群で α_1 -グロブリン分画比の低値傾向が認められた。剖検では, 雄の100 mg/kg群で腎臓の褪色が認められ, 雌雄の100 mg/kg群で腎臓の相対重量の高値あるいは高値傾向が認められた。病理組織学検査では, 雄の4, 20および100 mg/kg群で腎臓に近位尿細管上皮の硝子滴が, 甲状腺に胞細胞の肥大, コロイドの減少あるいはろ胞の不整形化が認められた。雌では100 mg/kg群で甲状腺に胞細胞の肥大およびコロイドの減少が認められた。

以上のことから, 本試験における5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による無影響量(NOEL)は, 雄で4 mg/kg/day未満, 雌で20 mg/kg/dayであると考えられた。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

5-エチリデン-2-ノルボルネン(純度:99.4%, Lot No. 6J01, 日本石油化学(株), 東京)は不快臭のある無色透明な液体である。入手後の被験物質は気密容器に入れ, 遮光, 室温で保存し, 残余被験物質を製造業者が分析し, 投与期間中の被験物質の安定性を確認した。溶媒は日本薬局方トウモロコシ油(片山化学工業(株))を用い, これに被験物質を所定の濃度となるように溶解させた。調製液は, 調製後4時間以内に投与に使用した。また, これらの調製液について濃度を分析し, 設定値の $\pm 5\%$ 以内に

あることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雄を7日間, 雌を8日間の検疫・馴化を行った後, 雌雄各42匹を選択して5週齢で試験に供した。投与日の体重範囲は雄が142~163 g, 雌が126~147 gであった。動物は, 温度22~24 °C, 湿度31~79%, 換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8:00から20:00まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で, ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内, 群分け後は個別で飼育した。飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて, 飲料水は札幌市水道水を自動給水装置あるいは給水器を用いて, 自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では1群あたり雌雄各5例のラットに100, 300および1000 mg/kgの5-エチリデン-2-ノルボルネンを14日間反復経口投与した結果, 雌雄の1000 mg/kg群の全例が死亡あるいは衰弱屠殺に至り, 100および300 mg/kg群では体重の低値傾向, 器官重量の変化などが認められた。

以上のことから, 高用量群には100 mg/kgを設定し, 以下公比5で除して, 中用量群には20 mg/kgを, 低用量群には4 mg/kgを, さらに, 媒体のみを投与する対照群も加え, 雌雄各4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも7匹とし, 対照群および100 mg/kg群には2群を割り付け, 投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った。

各個体の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて, 1日1回連続28日間, 強制的に胃内に投与した。

4. 検査項目

1) 一般状態観察

投与期間中および回復期間中に, 全例について1日1回以上の頻度で観察した。

2) 体重測定および摂餌量測定

体重は全例について, 投与1日(投与前), 投与2, 5, 7, 10, 14, 21および28日(投与終了日), 回復1, 2, 5, 7および14日ならびに剖検日に測定し, 投与1日から28

日、回復1日から14日の体重増加量および体重増加率を算出した。摂餌量は剖検日を除いて体重と同じ日に測定した。

3) 尿検査

投与4週および回復2週に生存例全例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い、同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンおよび潜血反応(以上、マルティスティックス、バイエル・三共)、色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し、21時間蓄尿について尿量(容量)、比重(屈折計、アタゴ)、ナトリウムおよびカリウム(以上、炎光光度法、自動炎光光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、カルシウム(OCPC法)ならびに無機リン(Fiske-SubbaRow法)(以上、自動分析装置7150形、日立製作所)を測定した。

4) 血液学検査

生存例全例について約16時間絶食させた後、エーテル麻酔下で大腿静脈より採血し、EDTA・2Kで処理した血液を用いて、赤血球数、平均赤血球容積、血小板数、白血球数(以上、電気抵抗法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)(以上、コールターカウンターT660型、コールター)、ヘマトクリット値(赤血球数、平均赤血球容積より算出)、平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数、ヘモグロビン量より算出)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値、ヘモグロビン量より算出)、網赤血球率(Brecher法)および白血球百分比(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定し、大腿静脈から採取した無処理血液を用いて凝固時間(流体粘度変化による空気圧測定法、マイクロコアグロメーター、グライナー)を測定した。さらに、腹部大動脈より採取した血液をクエン酸ナトリウムで処理した後、3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いて、プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上、血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A、バクスター)を測定した。

5) 血液生化学検査

生存例全例について約16時間絶食した後、エーテル麻酔下で、腹部大動脈より採取した血液を3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血清を用いてGOT(IFCC法)、GPT(IFCC法)、アルカリフォスファターゼ(Bessey-Lawry法)、乳酸脱水素酵素(Wróblewski & La Due法)、 γ -GTP(包接L- γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法)、グルコース(ヘキソキナーゼ法)、総コレステロール(酵素法)、トリグリセリド(遊離グリセロール消去法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法)、クレアチニン(Jaffé法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(Fiske-SubbaRow法)、総蛋白(ビウレット法)およびアルブミン(BCG法)(以

上、自動分析装置7150形、日立製作所)、ナトリウムおよびカリウム(以上、炎光光度法、自動炎光光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、A/G比(総蛋白、アルブミンより算出)ならびに蛋白分画(セルロースアセテート膜電気泳動法、全自動電気泳動装置CTE-150、常光)を測定した。

6) 剖検および器官重量測定

生存例については投与28日および回復14日の翌日に、衰弱のため屠殺した例については屠殺時に、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。死亡例については死亡発見後剖検した。また、脳、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体含む)、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣の重量を測定するとともに、絶対重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて相対重量を算出した。

7) 病理組織学検査

全例について肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳(大脳・小脳)、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、膵臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、胸骨および大腿骨(骨髄を含む)、脊髄(頸部)、骨格筋(外側広筋)、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃(前胃・腺胃)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精囊(凝固腺を含む)、前立腺、卵巣、子宮、膣および坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリン液で、精巣および精巣上体をブアン液で、眼球およびハーダー腺をデビッドソン液で固定した。これらの摘出器官・組織を常法にしたがってパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいはPAS染色標本を作製し、鏡検した。

5. 統計解析

体重、体重増加量および体重増加率、摂餌量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液生化学検査、器官の絶対重量および相対重量の結果についてBartlettの検定法を行い、等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法により解析し、不等分散の場合はKruskal-Wallisの検定法で解析した。Kruskal-Wallis法の解析の結果、有意差が認められた場合には、Mann-WhitneyのU-検定法で解析した。

尿比重および尿検査の定性的項目の結果については、Kruskal-Wallisの検定法で解析し、有意差が認められた場合は、Mann-WhitneyのU-検定法を用いて解析した。

これら対照群と被験物質投与群との間の検定においては、いずれも有意水準を5%とした。

結果

1. 一般状態

雄の100 mg/kg群の1例で、腹腔内腫瘍、自発運動の減少、呼吸不整、下痢および肛門周囲の被毛汚染が認め

られ衰弱したため投与9日に屠殺した。また、同群の1例が投与25日の投与前に死亡した。

生存例では、投与期間中に雌雄の100 mg/kg群の各1例に流涎が認められたが、回復期間には5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連する変化は認められなかった。

2. 体重 (Table 1, 2)

雄では100 mg/kg群で投与21日の体重に低値が認められ、投与期間中の体重増加量および体重増加率の低値も認められた。雌では100 mg/kg群で投与期間中の体重増加量および体重増加率の低値が認められた。

回復期間中の体重推移には、雌雄ともに対照群との間に差は認められなかった。

3. 摂餌量

雌雄ともに対照群との間に差は認められなかった。

4. 尿検査

投与期間最終週には、雄では100 mg/kg群で蛋白の陽性例の増加および採尿中の飲水量の低値が認められた。雌では100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加傾向がみられた。

その他に、雄の4 mg/kg群で蛋白陽性例およびケトン体陽性例の増加、カリウムおよびクロール排泄量の低値が認められたが、20 mg/kg群ではこれらの変化は認められないことから、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連はないものと考えられた。

回復期間最終週には、雄の100 mg/kg群で無機リン排泄量の高値が認められた。雌では対照群との間に差は認められなかった。

5. 血液学検査

投与期間終了時に雄の100 mg/kg群で白血球数の高値が認められた。雌では対照群との間に差は認められなかった。

回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群で網赤血球率の高値が、雌の100 mg/kg群でヘモグロビン量の高値が認められた。

6. 血液生化学検査 (Table 3, 4)

投与期間終了時には、雄の20および100 mg/kg群でアルブミン分画比の高値および α_1 -グロブリン分画比の低値、100 mg/kg群でA/G比の高値が認められた。雌では、100 mg/kg群でA/G比の高値、アルブミン分画比の高値、 α_1 -グロブリン分画比の低値傾向およびグルコースの低値が認められた。

回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群でクロールの低値が認められ、雌の100 mg/kg群では総蛋白の低値、アルブミンの低値、 β -グロブリン分画比の高値およびカルシウムの低値が認められた。

7. 器官重量 (Table 5, 6)

投与期間終了時には、雄では20 mg/kg以上の群で脳の相対重量の高値、100 mg/kg群で剖検時体重の低値、心臓および肺の絶対重量の低値ならびに腎臓の相対重量の高値が認められた。雌では、100 mg/kg群で剖検時体重の低値傾向、胸腺および腎臓の相対重量の高値が認められた。その他に、4 mg/kg群で肝臓の絶対重量および相対重量の低値が認められたが、低用量群のみでの変化であった。

回復期間終了時には雄の100 mg/kg群で肝臓の相対重量ならびに心臓の絶対重量および相対重量の高値が認められた。雌では、100 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値が認められた。

8. 剖検

雄の100 mg/kg群の衰弱屠殺例では盲腸と腹腔内脂肪織との癒着、盲腸の内腔拡張および粘膜灰白色化が認められたが、死亡例では異常所見は認められなかった。

投与期間終了時には、雄の100 mg/kg群で腎臓の褪色が3例に認められた。雌では5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連する異常所見は認められなかった。

回復期間終了時には、雌雄ともに5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連する異常所見は認められなかった。

9. 病理組織学検査 (Table 7, 8)

雄の100 mg/kg群の衰弱屠殺例では盲腸の壊死、炎症などが認められ、死亡例では腎臓に軽度の近位尿細管上皮の硝子滴が認められた。

投与期間終了時剖検例では、雄の腎臓で4および20 mg/kg群のそれぞれ5および7例に軽度の近位尿細管上皮の硝子滴が、100 mg/kg群の6例に中等度の近位尿細管上皮の硝子滴が、20および100 mg/kg群のそれぞれ2および3例に軽度の近位尿細管上皮の好酸性小体が、20および100 mg/kg群の各1例に中等度の近位尿細管上皮の好酸性小体が認められた。雄の甲状腺では、4、20および100 mg/kg群のそれぞれ1、1および6例にろ胞細胞の軽度の肥大およびコロイドの軽度の減少が、4および100 mg/kg群の各1例にろ胞の軽度の不整形化が認められた。雌の甲状腺では、100 mg/kg群の1例にろ胞細胞の軽度の肥大およびコロイドの軽度の減少が認められた。その他の所見は、発生例数が少なく、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連のない変化と考えられた。

回復期間終了時剖検例では、雄の腎臓で100 mg/kg群の4例に近位尿細管上皮の軽度の硝子滴が、100 mg/kg群の2例に近位尿細管上皮の軽度の好酸性小体が認められた。その他の所見は、発生例数が少なく、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連のない変化と考えられた。

考察

5-エチリデン-2-ノルボルネンの0(トウモロコシ油)、4、20および100 mg/kgを1群あたり雌雄各7あるいは14

匹のCrj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し、さらに0および100 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。

100 mg/kg群の雄1例に腹腔内腫瘍、自発運動の減少、呼吸不整、下痢および肛門周囲の被毛汚染が認められ、衰弱したため投与9日に屠殺した。この例では剖検で盲腸と腹腔内脂肪織との癒着、盲腸の内腔拡張および粘膜灰白色化が認められ、病理組織学検査では盲腸の壊死、炎症などが認められた。しかし、同群の他の例には盲腸への影響は認められておらず、本屠殺例の衰弱の原因と考えられる盲腸の変化と5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連は明らかにはならなかった。また、100 mg/kg群の雄1例が投与25日の投与前に死亡し、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による死亡が疑われたが、死因と考えられる変化は認められなかった。

生存例では、投与期間中に雌雄の100 mg/kg群の各1例に流涎が認められたが、5-エチリデン-2-ノルボルネンの粘膜に対する刺激性²⁾あるいは不快臭によるものと考えられ、毒性を示唆する変化ではないと考えられた。

体重推移では、雌雄の100 mg/kg群で投与期間中の体重増加量および増加率の低値が認められたが、回復期間には対照群との差は認められず、可逆的な変化と考えられた。

尿検査では、投与期間最終週に雄の100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加および採尿中の飲水量の低値が、雌の100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加傾向が認められた。しかし、回復期間にはこれらの変化は認められず、可逆的な変化と考えられた。

血液生化学検査では投与期間終了時に、雄の20および雌の100 mg/kg群でアルブミン分画比およびA/G比の高値ならびに α_1 -グロブリン分画比の低値あるいは低値傾向が認められた。これらの群では総蛋白およびアルブミン量に変化は認められないことから、アルブミン分画比の高値は α_1 -グロブリン分画比の低値による相対的増加と考えられ、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与により、 α_1 -グロブリン量の低値をもたらしたと考えられた。しかし、これらの変化は回復期間終了時には認められず、可逆的な変化と考えられた。

器官重量では、投与期間終了時に雌雄の100 mg/kg群で腎臓の相対重量の高値が認められ、雄の100 mg/kg群では剖検で腎臓の褐色が認められた。

病理組織学検査では、雄の4、20および100 mg/kg群で近位尿細管上皮の硝子滴が認められ、20および100 mg/kg群では近位尿細管上皮の好酸性小体も認められた。炭化水素化合物をラットに経口投与した場合、特に雄では腎臓の近位尿細管に硝子滴として沈着し、硝子滴の沈着の程度が強い場合には尿細管上皮の障害を引き起こすことが知られ²⁾、好酸性小体については硝子滴と同一物質との報告もある³⁾。したがって、本試験の雄の4 mg/kg以上の群で認められた近位尿細管上皮の硝子滴ならびに20 mg/kg以上の群で認められた好酸性小体は5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による影響と推察された。回復期間終了時には雄の100 mg/kg群で近位尿細管

上皮の硝子滴が認められたが、発生頻度は減少しており、器官重量および剖検で腎臓に異常は認められなかったことから、回復性のある変化と考えられた。

また、投与期間終了時には雄の4 mg/kg以上の群で甲状腺にろ胞細胞の肥大、コロイドの減少あるいはろ胞の不整形化が認められ、雌の100 mg/kg群でもろ胞細胞の肥大およびコロイドの減少が認められた。この甲状腺の重量増加を伴わない変化は、下垂体などの上位の内分泌系への影響を介した甲状腺機能の低下によると報告されている⁴⁾。しかし、本試験では下垂体の重量測定および病理組織学検査において異常は認められず、血中のTSHあるいは T_3 、 T_4 濃度等の測定を行っていないため、甲状腺でみられた変化の機序は明らかとはならなかった。また、回復期間終了時には甲状腺に異常は認められず、可逆的な変化と考えられた。

以上のほかに、尿検査では、回復期間最終週に、雄の100 mg/kg群で無機リン排泄量の高値が認められた。また、血液生化学検査では、投与期間終了時に雌の100 mg/kg群でグルコースの低値が認められ、回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群でクロールの低値、雌の100 mg/kg群で総蛋白の低値、アルブミン量の低値、 β -グロブリン分画比の高値およびカルシウムの低値が認められた。しかし、いずれも軽微な変化であり5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連はないと考えられた。

血液学検査では、投与期間終了時に雄の100 mg/kg群で白血球数の高値が認められたが、生存例では炎症性的変化は認められず、造血系の器官にも異常は認められなかった。また、白血球百分比でも異常は認められていないことから5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連は明らかにはならなかった。回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群で網赤血球率の高値が、雌の100 mg/kg群でヘモグロビン量の高値が認められた。しかし、他の赤血球パラメーターに異常は認められなかったことから、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与とは関連のない変化と考えられた。

器官重量では、投与期間終了時に雄の20 mg/kg以上の群で脳の相対重量の高値、100 mg/kg群で心臓および肺の絶対重量の低値が認められ、雌の100 mg/kg群で胸腺の相対重量の高値が認められたが、いずれも体重の低値に伴う変化であった。また、回復期間終了時には雌雄の100 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値が認められ、雄の100 mg/kg群では心臓の絶対重量および相対重量の高値が認められたが、病理組織学検査では特記すべき所見は認められず、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与とは関連のない変化と考えられた。

以上のように、雄の4 mg/kg以上の群で腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴、甲状腺のろ胞細胞の肥大、ろ胞の不整形化およびコロイドの減少が認められ、雌の100 mg/kg群で尿蛋白陽性例の増加傾向、 α_1 -グロブリンの低値傾向ならびに腎臓の相対重量の高値、甲状腺のろ胞細胞の肥大およびコロイドの減少が認められたことから、本試験における5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による無影響量(NOEL)は、雄で4 mg/kg/day未満、雌

で20 mg/kg/dayであると考えられた。

文献

- 1) B. Ballantyne, et al., *J. Appl. Toxicol.*, **17**, 211 (1997).
- 2) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation," Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands, 1990, pp.532-538.
- 3) S. Uwagasa, *J. Toxicol. Pathol.*, **5**, 195 (1992).
- 4) 長瀬すみら, "実験動物の臨床生化学データ-病理組織像との関連-", ソフトサイエンス社, 東京, 1976, p.339.

連絡先

試験責任者: 吉村浩幸
試験担当者: 茂野 均, 長谷淳一, 古川正敏,
河村公太郎, 武田みよ子,
引地のゆみ

(株)化合物安全性研究所
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Hiroyuki Yoshimura (Study director)
Hitoshi Shigeno, Junichi Nagaya,
Masatoshi Furukawa,
Kotaro Kawamura, Miyoko Takeda,
Noyumi Hikichi

Safety Research Institute for Chemical
Compounds Co., Ltd.
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,
004-0839, Japan
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Body weight changes of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
Administration period				
Number of animals	14	7	7	14
Day 1	151.7 ± 6.1	153.1 ± 3.8	150.4 ± 4.7	152.2 ± 4.1
2	160.6 ± 6.6	161.1 ± 4.6	159.3 ± 4.8	160.8 ± 4.8
5	188.4 ± 9.0	189.3 ± 5.6	185.7 ± 7.3	186.6 ± 5.3
7	205.4 ± 11.3	207.3 ± 6.4	202.9 ± 8.0	202.9 ± 6.0
10	232.9 ± 13.9	234.9 ± 8.3	229.3 ± 9.8	229.3 ± 7.3 (13)*
14	267.9 ± 15.4	269.0 ± 9.9	262.7 ± 13.5	258.8 ± 11.7 (13)
21	328.2 ± 19.6	324.7 ± 16.7	319.6 ± 18.0	309.6 ± 16.8* (13)
28	372.4 ± 23.4	362.0 ± 21.2	360.6 ± 25.0	350.5 ± 19.8 (12)
Day 1-28, gain	220.7 ± 20.6	208.9 ± 19.7	210.1 ± 23.6	197.9 ± 19.1* (12)
Body weight gain* (%)	145.5 ± 12.8	136.4 ± 12.2	139.7 ± 15.3	129.8 ± 12.8* (12)
Recovery period				
Number of animals	7			6
Day 1	369.7 ± 26.4	-	-	366.5 ± 19.7
2	373.0 ± 26.8	-	-	371.0 ± 20.9
5	392.4 ± 26.2	-	-	391.7 ± 24.8
7	401.4 ± 26.7	-	-	403.8 ± 28.1
14	434.4 ± 30.9	-	-	436.5 ± 34.4
Day 1-14, gain	64.7 ± 5.6	-	-	70.0 ± 16.4
Body weight gain* (%)	17.5 ± 1.0	-	-	19.0 ± 3.6

Values are expressed as Mean ± S.D. (gram)

- : blank value.

Significantly different from 0 mg/kg group (*p < 0.05)

a) Values in parentheses are number of animals examined.

b) (Body weight gain/body weight on day 1) × 100.

Table 2 Body weight changes of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
Administration period				
Number of animals	14	7	7	14
Day 1	136.1 ± 6.0	137.1 ± 6.7	135.4 ± 5.3	136.1 ± 6.2
2	141.0 ± 6.4	139.6 ± 5.3	142.3 ± 6.0	141.7 ± 6.4
5	155.7 ± 9.1	156.3 ± 8.3	155.0 ± 8.7	152.9 ± 10.6
7	164.6 ± 9.2	161.7 ± 8.4	163.4 ± 7.3	159.2 ± 9.3
10	176.8 ± 10.6	169.4 ± 9.5	173.3 ± 7.8	169.1 ± 10.6
14	191.5 ± 13.4	181.4 ± 11.7	188.9 ± 9.6	182.4 ± 12.8
21	216.1 ± 17.6	204.9 ± 17.2	211.9 ± 7.8	202.9 ± 17.4
28	236.5 ± 20.2	225.6 ± 21.6	235.4 ± 7.2	221.8 ± 18.6
Day 1-28, gain	100.4 ± 16.4	88.4 ± 15.5	100.0 ± 7.9	85.7 ± 13.4*
Body weight gain* (%)	73.6 ± 10.8	64.2 ± 8.5	74.0 ± 7.8	62.8 ± 8.0**
Recovery period				
Number of animals	7			7
Day 1	241.7 ± 31.0	-	-	226.3 ± 19.0
2	245.0 ± 33.3	-	-	232.9 ± 17.8
5	251.4 ± 33.9	-	-	239.9 ± 20.2
7	260.7 ± 37.9	-	-	252.7 ± 18.8
14	275.0 ± 43.1	-	-	264.1 ± 19.0
Day 1-14, gain	33.3 ± 13.7	-	-	37.9 ± 5.3
Body weight gain* (%)	13.4 ± 4.3	-	-	16.9 ± 2.9

Values are expressed as Mean ± S.D. (gram)

- : blank value.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

a) (Body weight gain / body weight on day 1) × 100.

Table 3 Blood chemical findings of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	6	7	6
Total protein (g/dL)	5.63 ± 0.20	5.51 ± 0.23	5.57 ± 0.22	5.42 ± 0.17	5.87 ± 0.29	6.00 ± 0.25
Albumin (g/dL)	2.31 ± 0.07	2.33 ± 0.08	2.40 ± 0.12	2.38 ± 0.04	2.41 ± 0.11	2.42 ± 0.08
A/G	0.701 ± 0.053	0.736 ± 0.054	0.759 ± 0.043	0.790 ± 0.057*	0.704 ± 0.076	0.680 ± 0.042
Protein fraction (%)						
Albumin	53.34 ± 2.19	54.31 ± 1.99	55.70 ± 1.44*	57.48 ± 0.98**	52.80 ± 3.37	51.38 ± 1.36
α_1 -globulin	23.56 ± 1.66	22.50 ± 1.92	21.06 ± 1.55*	19.02 ± 0.81**	24.49 ± 2.30	25.65 ± 1.84
α_2 -globulin	7.09 ± 0.85	6.74 ± 1.57	6.54 ± 0.87	7.40 ± 0.46	5.77 ± 0.62	5.97 ± 0.57
β -globulin	15.04 ± 0.84	15.41 ± 1.11	15.49 ± 1.21	15.28 ± 0.71	15.21 ± 0.97	15.43 ± 1.52
γ -globulin	0.97 ± 0.52	1.03 ± 0.44	1.21 ± 0.92	0.82 ± 0.38	1.73 ± 0.69	1.57 ± 0.50
GOT (IU/L)	93.0 ± 12.8	80.4 ± 5.9	93.1 ± 19.6	89.7 ± 23.2	104.0 ± 16.6	98.3 ± 14.2
GPT (IU/L)	22.9 ± 3.8	23.6 ± 4.3	23.0 ± 4.6	22.3 ± 4.5	25.7 ± 3.0	22.8 ± 4.0
ALP (IU/dL)	425.6 ± 110.7	478.1 ± 77.5	482.4 ± 43.4	360.5 ± 80.2	416.9 ± 101.4	355.3 ± 56.9
LDH (IU/dL)	1991.6 ± 634.9	1197.3 ± 257.8	1804.6 ± 723.5	1644.7 ± 968.3	1959.4 ± 633.6	1779.8 ± 462.1
γ -GTP (IU/dL)	1.00 ± 0.30	1.16 ± 0.43	1.23 ± 0.65	1.12 ± 0.33	1.04 ± 0.13	0.90 ± 0.38
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	139.4 ± 19.3	141.7 ± 16.9	132.9 ± 11.7	126.3 ± 16.8	145.9 ± 16.6	151.0 ± 20.4
Total cholesterol (mg/dL)	53.6 ± 5.1	47.0 ± 7.3	56.4 ± 9.1	60.8 ± 5.5	48.4 ± 11.6	50.0 ± 4.8
Triglyceride (mg/dL)	42.9 ± 11.7	42.1 ± 12.2	40.3 ± 14.5	57.2 ± 24.2	37.0 ± 15.0	42.7 ± 11.4
Urea nitrogen (mg/dL)	13.43 ± 2.16	13.41 ± 1.27	13.39 ± 1.09	14.05 ± 1.10	17.43 ± 1.60	16.68 ± 1.98
Creatinine (mg/dL)	0.47 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.48 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.50 ± 0.00
Sodium (mEq/L)	145.79 ± 1.58	143.57 ± 2.17	145.00 ± 1.50	145.33 ± 1.57	145.86 ± 1.28	145.17 ± 0.93
Potassium (mEq/L)	5.021 ± 0.309	4.986 ± 0.458	5.324 ± 0.233	5.453 ± 0.222	4.734 ± 0.309	4.887 ± 0.316
Chlorine (mEq/L)	106.4 ± 1.4	105.9 ± 2.0	106.6 ± 1.1	105.3 ± 0.8	108.3 ± 1.4	106.0 ± 1.4*
Calcium (mg/dL)	10.20 ± 0.26	9.80 ± 0.42	10.00 ± 0.34	10.07 ± 0.26	9.57 ± 0.39	9.72 ± 0.40
Inorganic phosphorous (mg/dL)	9.01 ± 0.67	8.99 ± 0.27	9.06 ± 0.69	9.47 ± 0.43	7.70 ± 0.23	8.05 ± 0.44

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 4 Blood chemical findings of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	6.14 ± 0.36	5.83 ± 0.28	5.99 ± 0.31	5.83 ± 0.21	6.51 ± 0.40	6.04 ± 0.22*
Albumin (g/dL)	2.64 ± 0.20	2.49 ± 0.16	2.59 ± 0.12	2.69 ± 0.18	2.76 ± 0.16	2.57 ± 0.13*
A/G	0.757 ± 0.030	0.744 ± 0.047	0.761 ± 0.035	0.857 ± 0.070**	0.736 ± 0.056	0.740 ± 0.040
Protein fraction (%)						
Albumin	59.26 ± 1.77	58.81 ± 2.80	60.14 ± 1.01	62.79 ± 1.52**	58.50 ± 2.38	57.13 ± 2.80
α_1 -globulin	18.04 ± 2.12	18.59 ± 2.09	18.07 ± 1.04	16.06 ± 0.93	19.37 ± 1.90	19.11 ± 1.35
α_2 -globulin	6.17 ± 0.74	6.46 ± 0.79	5.33 ± 0.48	5.69 ± 0.75	5.40 ± 0.68	5.07 ± 0.94
β -globulin	15.24 ± 1.35	14.54 ± 1.38	14.99 ± 0.95	14.10 ± 0.81	14.09 ± 1.18	15.81 ± 1.38*
γ -globulin	1.29 ± 0.30	1.60 ± 0.68	1.47 ± 0.24	1.37 ± 0.59	2.64 ± 1.03	2.87 ± 0.94
GOT (IU/L)	123.4 ± 31.1	106.0 ± 34.1	108.4 ± 14.9	117.7 ± 25.4	107.0 ± 17.7	113.1 ± 22.8
GPT (IU/L)	20.9 ± 4.2	20.6 ± 2.6	21.9 ± 4.6	22.3 ± 5.6	25.9 ± 4.0	22.7 ± 2.9
ALP (IU/dL)	279.6 ± 41.4	287.4 ± 55.9	289.1 ± 64.8	269.9 ± 79.2	163.0 ± 44.1	146.3 ± 27.8
LDH (IU/dL)	3080.9 ± 1547.7	2206.0 ± 1244.4	2317.7 ± 637.7	2802.4 ± 1042.1	2261.4 ± 799.1	2820.7 ± 1117.0
γ -GTP (IU/dL)	1.13 ± 0.38	1.17 ± 0.35	1.26 ± 0.43	1.04 ± 0.46	1.03 ± 0.45	0.97 ± 0.26
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	132.6 ± 15.3	122.0 ± 12.1	135.0 ± 18.0	113.3 ± 6.0*	132.3 ± 23.6	138.9 ± 21.7
Total cholesterol (mg/dL)	62.6 ± 21.6	53.4 ± 12.9	58.0 ± 4.0	54.3 ± 15.0	70.4 ± 7.9	73.1 ± 13.1
Triglyceride (mg/dL)	15.9 ± 6.8	11.0 ± 2.6	16.0 ± 4.7	19.3 ± 5.5	19.0 ± 21.0	19.4 ± 8.6
Urea nitrogen (mg/dL)	16.21 ± 2.28	16.04 ± 0.91	16.94 ± 1.43	15.96 ± 2.25	17.20 ± 1.71	17.27 ± 0.73
Creatinine (mg/dL)	0.51 ± 0.09	0.47 ± 0.08	0.51 ± 0.07	0.51 ± 0.04	0.57 ± 0.05	0.56 ± 0.05
Sodium (mEq/L)	143.86 ± 0.63	143.71 ± 0.76	143.64 ± 0.75	143.50 ± 1.63	144.29 ± 1.32	144.86 ± 1.03
Potassium (mEq/L)	4.613 ± 0.263	4.533 ± 0.275	4.404 ± 0.255	4.719 ± 0.255	4.344 ± 0.376	4.377 ± 0.462
Chlorine (mEq/L)	107.1 ± 1.8	108.1 ± 1.6	107.6 ± 1.4	106.9 ± 2.8	107.9 ± 1.7	107.0 ± 0.8
Calcium (mg/dL)	9.91 ± 0.23	9.81 ± 0.21	9.99 ± 0.50	9.89 ± 0.36	9.84 ± 0.25	9.54 ± 0.21*
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.86 ± 0.94	7.61 ± 1.07	7.99 ± 0.95	8.00 ± 1.10	6.23 ± 0.59	6.71 ± 0.27

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	6	7	6
Body weight (g)	354.1 ± 14.7	335.6 ± 19.5	333.1 ± 22.5	310.7 ± 13.8**	397.3 ± 27.0	402.8 ± 31.4
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.036 ± 0.054	1.963 ± 0.135	2.057 ± 0.078	1.995 ± 0.104	2.091 ± 0.063	2.085 ± 0.078
Liver (g)	11.297 ± 0.854	10.237 ± 0.960	10.649 ± 1.357	10.915 ± 1.669	11.023 ± 1.162	12.588 ± 1.575
Heart (g)	1.270 ± 0.096	1.169 ± 0.070	1.194 ± 0.109	1.118 ± 0.065*	1.323 ± 0.106	1.480 ± 0.076*
Lung (g)	1.349 ± 0.061	1.253 ± 0.099	1.343 ± 0.081	1.220 ± 0.045*	1.360 ± 0.077	1.332 ± 0.127
Spleen (g)	0.653 ± 0.079	0.623 ± 0.106	0.646 ± 0.089	0.578 ± 0.055	0.690 ± 0.102	0.688 ± 0.085
Kidney (g)	2.683 ± 0.204	2.561 ± 0.245	2.719 ± 0.267	2.657 ± 0.231	2.876 ± 0.313	3.045 ± 0.353
Pituitary gland (mg)	11.51 ± 1.42	10.87 ± 1.50	10.79 ± 0.78	10.05 ± 0.87	13.14 ± 1.27	13.42 ± 1.75
Thymus (mg)	613.4 ± 131.1	574.0 ± 98.4	577.7 ± 57.5	626.0 ± 140.4	601.6 ± 132.4	620.8 ± 112.3
Thyroid (mg)	22.129 ± 3.036	21.086 ± 2.806	21.086 ± 2.490	19.350 ± 2.089	20.000 ± 3.643	21.450 ± 3.313
Adrenal (mg)	58.000 ± 8.981	55.143 ± 6.842	50.571 ± 5.159	54.667 ± 7.230	60.571 ± 7.413	65.833 ± 4.355
Testis (g)	3.150 ± 0.181	2.969 ± 0.360	3.120 ± 0.182	2.828 ± 0.199	3.174 ± 0.185	3.080 ± 0.166
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.574 ± 0.018	0.587 ± 0.052	0.621 ± 0.041*	0.643 ± 0.010**	0.527 ± 0.039	0.520 ± 0.046
Liver (g%)	3.191 ± 0.226	3.050 ± 0.202	3.190 ± 0.238	3.503 ± 0.412	2.773 ± 0.217	3.120 ± 0.260*
Heart (g%)	0.359 ± 0.021	0.350 ± 0.018	0.359 ± 0.024	0.360 ± 0.019	0.333 ± 0.010	0.372 ± 0.026**
Lung (g%)	0.381 ± 0.025	0.376 ± 0.030	0.406 ± 0.021	0.393 ± 0.023	0.344 ± 0.026	0.332 ± 0.042
Spleen (g%)	0.184 ± 0.023	0.186 ± 0.028	0.193 ± 0.023	0.187 ± 0.020	0.173 ± 0.024	0.170 ± 0.011
Kidney (g%)	0.756 ± 0.044	0.761 ± 0.052	0.814 ± 0.044	0.855 ± 0.062**	0.724 ± 0.053	0.757 ± 0.083
Pituitary gland (mg%)	3.254 ± 0.405	3.229 ± 0.288	3.240 ± 0.171	3.237 ± 0.280	3.309 ± 0.269	3.328 ± 0.290
Thymus (mg%)	173.669 ± 38.209	172.611 ± 37.170	173.874 ± 19.136	201.773 ± 44.644	151.024 ± 28.834	153.898 ± 23.674
Thyroid (mg%)	6.246 ± 0.794	6.294 ± 0.866	6.383 ± 1.083	6.248 ± 0.799	5.007 ± 0.594	5.343 ± 0.840
Adrenal (mg%)	16.373 ± 2.392	16.459 ± 1.979	15.161 ± 0.788	17.592 ± 2.072	15.277 ± 1.885	16.463 ± 2.079
Testis (g%)	0.890 ± 0.040	0.886 ± 0.100	0.940 ± 0.082	0.910 ± 0.065	0.801 ± 0.062	0.767 ± 0.069

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	219.1 ± 10.0	209.1 ± 18.6	217.9 ± 5.7	203.1 ± 19.9	253.7 ± 39.0	245.0 ± 18.2
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.930 ± 0.103	1.947 ± 0.074	1.869 ± 0.135	1.849 ± 0.088	2.010 ± 0.108	1.949 ± 0.053
Liver (g)	6.829 ± 0.425	6.030 ± 0.623*	6.684 ± 0.485	6.651 ± 0.784	6.797 ± 1.149	6.931 ± 0.645
Heart (g)	0.834 ± 0.036	0.760 ± 0.052	0.823 ± 0.049	0.806 ± 0.079	0.917 ± 0.068	0.911 ± 0.082
Lung (g)	1.046 ± 0.094	1.011 ± 0.057	1.049 ± 0.045	1.027 ± 0.111	1.080 ± 0.067	1.086 ± 0.028
Spleen (g)	0.487 ± 0.101	0.463 ± 0.064	0.453 ± 0.057	0.466 ± 0.100	0.464 ± 0.043	0.501 ± 0.084
Kidney (g)	1.663 ± 0.128	1.699 ± 0.143	1.654 ± 0.091	1.681 ± 0.140	1.794 ± 0.210	1.826 ± 0.165
Pituitary gland (mg)	13.13 ± 2.98	13.04 ± 2.05	12.69 ± 1.62	12.80 ± 1.53	14.11 ± 1.80	13.87 ± 2.19
Thymus (mg)	481.3 ± 66.6	482.1 ± 66.8	485.9 ± 51.8	578.0 ± 107.5	455.7 ± 103.9	466.1 ± 50.7
Thyroid (mg)	14.429 ± 3.355	15.371 ± 3.042	14.933 ± 2.252	15.343 ± 3.260	15.857 ± 2.293	14.000 ± 1.697
Adrenal (mg)	68.143 ± 11.908	59.857 ± 6.094	64.571 ± 9.090	67.286 ± 7.675	63.286 ± 6.047	65.429 ± 4.860
Ovary (mg)	91.143 ± 9.245	91.714 ± 8.902	89.714 ± 9.827	92.714 ± 11.743	92.143 ± 12.240	91.714 ± 13.363
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.881 ± 0.048	0.934 ± 0.084	0.856 ± 0.066	0.914 ± 0.058	0.809 ± 0.141	0.799 ± 0.069
Liver (g%)	3.119 ± 0.150	2.886 ± 0.195*	3.069 ± 0.203	3.270 ± 0.123	2.679 ± 0.122	2.827 ± 0.098*
Heart (g%)	0.380 ± 0.018	0.366 ± 0.014	0.379 ± 0.016	0.399 ± 0.019	0.369 ± 0.032	0.371 ± 0.011
Lung (g%)	0.477 ± 0.031	0.486 ± 0.024	0.483 ± 0.022	0.504 ± 0.017	0.431 ± 0.047	0.444 ± 0.030
Spleen (g%)	0.223 ± 0.039	0.220 ± 0.014	0.209 ± 0.024	0.229 ± 0.038	0.184 ± 0.028	0.206 ± 0.033
Kidney (g%)	0.759 ± 0.045	0.814 ± 0.047	0.759 ± 0.045	0.830 ± 0.052*	0.711 ± 0.042	0.744 ± 0.033
Pituitary gland (mg%)	5.991 ± 1.325	6.251 ± 0.952	5.831 ± 0.820	6.317 ± 0.672	5.630 ± 0.832	5.686 ± 0.962
Thymus (mg%)	219.017 ± 22.731	230.400 ± 22.794	222.671 ± 19.395	283.333 ± 34.332**	180.579 ± 40.788	190.486 ± 17.852
Thyroid (mg%)	6.556 ± 1.353	7.367 ± 1.410	6.855 ± 0.973	7.576 ± 1.554	6.323 ± 0.992	5.714 ± 0.555
Adrenal (mg%)	31.234 ± 6.143	28.616 ± 1.385	29.701 ± 4.727	33.244 ± 3.710	25.323 ± 3.618	26.839 ± 2.857
Ovary (mg%)	41.711 ± 5.073	43.959 ± 3.815	41.134 ± 3.813	46.126 ± 7.555	36.831 ± 6.477	37.567 ± 5.791

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 7 Histopathological findings of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item		End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals examined		7	7	7	6	7	6
Organ: Findings	Grade						
Kidney: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	Total	1	5	7	6	0	4
	+	1	5	7	0	0	4
	++	0	0	0	6	0	0
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	Total	0	0	3	4	0	2
	+	0	0	2	3	0	2
	++	0	0	1	1	0	0
Thyroid: Hypertrophy, follicular cell	+	0	1	1	6	0	0
	Decrease, colloid	+	0	1	1	6	0
	Irregular, shape, follicle	+	0	1	0	1	0

Values are number of animals with findings.

Grade of histopathological finding; +: slight, ++: moderate.

Table 8 Histopathological findings of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item		End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Thyroid: Hypertrophy, follicular cell	+	0	0	0	1	0	0
	Decrease, colloid	+	0	0	0	1	0

Values are number of animals with findings.

Grade of histopathological finding; +: slight.