

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンの ラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 1,3,5-Tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione in Rats

要約

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンを雌雄ラットに1回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は2000 mg/kgを高用量とし、以下1000および500 mg/kgとした。対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。各群の使用動物数は雌雄各5例とした。

死亡例は、いずれの群にも認められなかった。一般状態、体重および剖検所見において、雌雄とも投与による変化はみられなかった。

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンのLD₅₀値は、雌雄とも2000 mg/kg以上と考えられる。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質の1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンは、非揮発性白色結晶粉末である[Lot No.00915-1, 純度: 99.0%, 日産化学工業(株)(東京)]。入手後は、室温・遮光条件下で保管した。

被験物質は、注射用水で溶解して調製した。なお、2, 20および200 mg/mLの調製液は、室温・遮光条件下で7日間保存しても安定性に問題のないことを確認している。投与に使用した各投与検体中の被験物質濃度を測定した結果、被験物質濃度に問題はなかった。

2. 使用動物および飼育条件

4週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット[SPF, Crj:CD(SD)IGS]を日本チャールス・リバー(株)から購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後2日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常の認められなかった動物を群分けした。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与日に行った。

動物は、室温20~26℃、湿度40~70%、明暗各12時間(照明: 午前6時~午後6時)、換気回数12回/時に維持されている飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中および群分け前の絶食時間中はステンレス製ケージを用いて1ケージ当たり5匹までの雌雄別群飼育とし、群分け後はステンレス製ケージを用いて個別飼育した。飼料は、

固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻から投与までの約20時間と投与後約6時間まで絶食させた。飲料水は、水道水を自由に摂取させた。ただし、群分け時から投与後約6時間までは絶水させた。

3. 投与経路、投与方法および投与量

投与経路は経口投与を選択した。投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスプレイボアザブル注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、投与直前に測定した体重を基準として10 mL/kgで算出した。投与回数は1回とした。投与日の週齢は5週齢であり、体重範囲は雄が104~113 g、雌が95~101 gであった。

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンのラット経口投与時のLD₅₀値は10000 mg/kg以上との報告がある。そこで、当試験では、2000 mg/kgを高用量とし、以下公比2により1000および500 mg/kg群を設定した。また、対照として媒体(注射用水)のみを同容量投与する群を設けた。1群の動物数は、雌雄それぞれ5例とした。

4. 観察および検査項目

1) 観察期間

投与後14日間とした。

2) 一般状態

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

3) 体重測定

投与日および投与後1, 3, 7, 10ならびに14日に測定した。

4) 剖検

観察期間終了時にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

5. 統計解析

当試験では、死亡例が認められなかったことから、LD₅₀値は概略の範囲を推定した。

体重について、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、

有意ならばDunnett法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば順位を利用したDunnett型の検定法により行った。

結果

1. 死亡状況および一般状態

いずれの群の雌雄においても、死亡例は認められなかった。

一般状態の観察において、いずれの群の雌雄とも異常はみられなかった。

2. 体重推移

各投与群の雌雄とも、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

3. 剖検所見

いずれの群の雌雄においても、異常はみられなかった。

考察

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンは2000 mg/kgを投与しても、雌雄ともに死亡例は認められず、LD₅₀値は雌雄とも2000 mg/kg以上と考えられる。

文献

- 1) 日産化学工業, 未発表.

連絡先

試験責任者: 古橋忠和

試験担当者: 三輪芳久, 牧野浩平, 内藤一嘉,
吉島賢一

(株)日本バイオリサーチセンター羽島研究所
〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6-104
Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)

Yosihisa Miwa, Kohei Makino,

Kazuyoshi Naito, Ken-ichi Yoshijima

Nihon Bioresearch Inc.

6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-6251, Japan

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

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 1,3,5-Tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by Oral Administration in Rats

要約

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに、雌雄親動物の生殖能力および児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。投与量は、1000 mg/kgを最高用量とし、以下300, 100および30 mg/kgとした。対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。各群の使用動物数は雌雄各12例とした。

1. 反復投与毒性

雄においては、いずれの群とも死亡および瀕死例は認められなかった。一般状態、体重、摂餌量、尿検査成績、血液学検査成績、血液生化学検査成績、剖検所見、器官重量および病理組織学検査成績では、投与による変化はみられなかった。

雌においては、いずれの群とも死亡および瀕死例は認められなかった。一般状態、体重、摂餌量、剖検所見および器官重量では、投与による変化はみられなかった。病理組織学検査では、1000 mg/kg群で肝臓に髄外造血がみられた。

2. 生殖発生毒性

病理組織学検査では、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膈および乳腺に投与による変化はみられなかった。

発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎雌数、妊娠期間、分娩状態、哺育状態、受胎率、妊娠黄体数、着床数、着床率および出産率では、投与による変化はみられなかった。

総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、性比、分娩率、児の産出率、出生率、哺育4日の生存児数、新生児の4日の生存率、新生児の外表、一般状態、体重および剖検所見では、投与による変化はみられなかった。

以上のように、1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンの一般毒性学的無影響量は、雄では1000 mg/kg投与しても毒性学的影響が認められなかったことから1000 mg/kg/dayと考えられる。また、雌では1000 mg/kg投与により肝臓に髄外造血が認められたことから300 mg/kg/dayと考えられる。生殖発生毒性学的な無影響量は、1000 mg/kg投与しても雌雄親動物、児動物とも影響は認められな

ったことからいずれも1000 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質の1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンは、非揮発性白色結晶粉末である[Lot No.00915-1, 純度: 99.0%, 日産化学工業(株)(東京)]。入手後は、室温・遮光条件下で保管した。なお、投与期間終了後、残余被験物質は、再分析し、使用期間中の安定性を確認した。

被験物質は、注射用水で溶解して調製した。調製に際して、被験物質の純度による換算は実施しなかった。なお、調製液は、室温・遮光条件下で7日間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため、各濃度の調製液は調製後、室温・遮光条件下で保管し、調製後7日以内に使用した。投与開始日に使用した投与液中の被験物質濃度を測定した結果、被験物質濃度に問題はなかった。

2. 使用動物および飼育条件

8週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット[SPF, Crj:CD (SD)IGS]を日本チャールス・リバー(株)から購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後7日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けした。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日に行った。

動物は、室温20~26℃、湿度40~70%、明暗各12時間(照明:午前6時~午後6時)、換気回数12回/時に維持されている飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製ケージを用いて1ケージ当たり5匹までの雌雄別群飼育とし、群分け後はステンレス製ケージを用いて個別飼育した。母動物は、妊娠18日以降オートクレーブ処理した床敷(サンフレック、日本チャールス・リバー(株))を入れたプラスチック製ケージで個別飼育し、自然分娩および哺育させた。飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を自由に摂取させた。ただし、雄は剖検前日の午後4時頃から絶食した。飲料水は水道水を自由に摂取させた。

3. 投与経路, 投与方法, 投与量および投与期間

投与経路は, 経口投与を選択した。投与に際しては, 金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスプレイ用注射筒を用いて, 強制経口投与した。投与液量は, 雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし, 5 mL/kgで算出した。雌では, 交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を, 妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日の体重を, 授乳期間中は哺育0日の体重を基準とし, 5 mL/kgで算出した。

投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり, 体重範囲は雄が335~364 g, 雌が233~263 gであった。

投与量は, 雄ラットを用いた2週間経口投与による予備試験¹⁾(投与段階: 0, 125, 250, 500および1000 mg/kg)の結果により決定した。すなわち, 死亡はいずれの群にも認められず, 一般状態, 体重, 摂餌量および剖検にも異常はみられなかった。そこで, 当試験では, 1000 mg/kgを最高用量とし, 以下公比約3により300, 100および30 mg/kgとした。また, 対照として媒体(注射用水)のみを同容量投与する群を設けた。1群の動物数は, 雌雄それぞれ12例とした。

投与期間は, 雄では交配前14日間とその後35日間の合計49日間とし, 雌では交配前14日間, 交配期間中(最長14日間), 妊娠期間中および哺育3日までの合計40~46日間とした。なお, 投与開始日を投与1日とした。

4. 観察および検査項目

1) 雄

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は, 投与前・後の1日2回観察した。

(2) 体重測定

体重は, 1週間に2回測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は, 交配開始前14日間および交配期間終了後に1週間に2回測定した。

(4) 尿検査

投与期間終了前に採尿ケージを用いて絶食・給水で3時間で採取した尿(3時間尿)と引き続いて給餌・給水で21時間で採取した尿(21時間尿)ならびにそれらを合計した尿(24時間尿)について, 以下の検査を実施した。

3時間尿: 色調は, 外観判定とした。pH, 蛋白質, ブドウ糖, ケトン体, ビリルビン, 潜血, ウロビリノーゲンは, 尿検査試験紙(ウロペーパー II 栄研7, 栄研化学(株))に尿を滴下後に尿自動分析装置(US-2100, 栄研化学(株))を用いて検査した。尿沈渣は, 沈渣を尿沈渣染色液で染色後に顕微鏡下で観察した。なお, 採尿は, 当日の検体投与後に行った。

21時間尿: 比重を屈折率により屈折型尿比重計(ユリベット-II D, (株)ニコン)を用いて測定した。

24時間尿: 尿量を比重と重量から算出した。

(5) 血液学検査

最終投与の翌日にペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈からカニューレーションにより血液を採取し, 以下の血液学検査を実施した。

赤血球数(RBC), ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 血小板数および白血球数(WBC)は, EDTA-2K処理した血液について, 多項目自動血球計数装置(Sysmex K-4500, シスメックス(株))を用いて測定した。さらに, 平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

網状赤血球比率は, EDTA-2K処理した血液をBrecher法により超生体染色してスライドガラスに塗抹後, Giemsa染色標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の網状赤血球数を計数した。

白血球百分率は, EDTA-2K処理した血液をスライドガラスに塗抹し, May-Giemsa染色標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

プロトロンビン時間(PT), 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)およびフィブリノーゲン濃度は, 3.13 %クエン酸ナトリウムで処理後, 遠心分離(約4℃, 3000 rpm, 15分間)して得た血漿について, 散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスター II, 三共(株))を用いて測定した。

(6) 血液生化学検査

血液学検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液から遠心分離(約4℃, 3000 rpm, 15分間)して得た血清について, 以下の血液生化学検査を実施した。

ASTはMDH-UV法, ALTはLDH-UV法, ALPはp-ニトロフェニルリン酸基質法, γ-GTPはL-γグルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法, 総蛋白はBiuret法, 総ビリルビンは安定化ジアゾニウム塩法, 尿素窒素はウレアーゼ-GIDH法, クレアチニンはクレアチナーゼ-F-DAOS法, ブドウ糖はヘキシキナーゼ-G-6-PDH法, 総コレステロールはCOD-HDAOS法, トリグリセライドはGPO-HDAOS法, Caはo-CPC法, 無機リンはPNP-XDH法, Na, KおよびClはイオン選択電極法により, いずれも生化学自動分析装置(AU 400, オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

アルブミン量は総蛋白量および蛋白分画値[電気泳動法, 自動電気泳動装置(AES 310, オリンパス光学工業(株))]から, A/G(アルブミン/グロブリン)は蛋白分画値から算出した。

(7) 剖検および器官重量測定

採血した動物をさらに放血致死させた後に剖検した。脳(大脳, 小脳, 延髄), 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣および精巣上体は重量を測定した。ただし, 下垂体および甲状腺重量は, 20%中性緩衝ホルマリンで1晩固定後測定した。これらの器官は, 肺, 気管, 膵臓, 唾液腺(舌下腺・顎下腺), 食道, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, リンパ節(下顎・腸間膜), 膀胱, 精囊, 前立腺, 上皮小体, 脊髄, 坐骨神経, 眼球, ハーダー腺および骨髄(胸骨・大腿骨)とともに20%中性緩衝ホルマリンで固定した。た

だし、精巢および精巢上体はブアン液で約24時間固定後90%アルコールに再固定し、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリンで1晩固定後20%中性緩衝ホルマリンに再固定した。

(8) 病理組織学検査

対照群および1000 mg/kg群について、各器官・組織のHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。1000 mg/kg群の雄の検査で脾臓に髄外造血ならびに1000 mg/kg群の雌の検査で肝臓に髄外造血が認められたため、30, 100および300 mg/kg群の脾臓および肝臓についても同様に検査した。

2) 雌

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。

(2) 性周期

性周期は、投与開始日から交尾確認日まで毎日1回観察した。なお、発情期が連続2日間にわたって観察された場合は1回として発情回数を計数した。

(3) 体重測定

体重は、交配開始前14日間および交配期間中は1週間に2回、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日に、哺育期間中は哺育0および4日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間までは1週間に2回、妊娠期間中は妊娠2, 9, 16および21日に、哺育期間中は哺育4日に測定した。

(5) 交尾不成立雌

交尾不成立雌は、交配期間終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

(6) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠21日から妊娠25日の午前10時まで毎日行った。午前10時に分娩が終了していた場合、その日を哺育0日とした。

(7) 妊娠25日までに分娩しなかった動物

妊娠25日までに分娩しなかった雌は、エーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

(8) 哺育状態の観察

母動物は、哺育状態を哺育4日まで毎日観察した。

(9) 剖検および器官重量測定

哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床数および妊娠黄体数を数えた。脳(大脳、小脳、延髄)、下垂体、甲状腺、胸腺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および卵巣は重量を測定した。ただし、下垂体および甲状腺重量は、20%中性緩衝ホルマリンで1晩固定後測定した。これらの器官は、肺、気管、脾臓、唾液腺(舌下腺・顎下腺)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、リンパ節(下顎・腸間膜)、膀胱、子宮、陰、上皮小体、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髓(胸骨・大腿骨)および乳腺とともに20%中性緩衝ホルマリンで固定した。ただし、眼

球はグルタルアルデヒド・ホルマリンで1晩固定後20%中性緩衝ホルマリンに再固定した。

(10) 病理組織学検査

対照群および1000 mg/kg群について、各器官・組織のHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。1000 mg/kg群の検査で肝臓に髄外造血が認められたため、30, 100および300 mg/kg群の肝臓についても同様に検査した。

3) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

14日間投与した雌雄を同一群内で1対1に組み合わせて同居交配した。交配期間は14日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、陰垢内に精子または陰栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠0日として起算した。

4) 児動物

(1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。

(2) 児動物の観察

児動物は、一般状態および死亡の有無を毎日1回観察した。

(3) 体重測定

体重は、哺育0日(出生日)および4日に測定した。

(4) 剖検

生存児は、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

5. 統計解析

統計解析は以下に示したように、対照群と各投与群の間で行い、危険率を5%とした。

体重、摂餌量、尿量、尿比重、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、発情回数、交尾所要日数、妊娠期間、妊娠黄体数、着床数、着床率、総出産児数、死産児数、新生児数、分娩率、児の産出率、出生率、哺育4日の生存児数、新生児の4日の生存率、性比および外表異常の出現率は、各群で平均値および標準偏差を算出した。その後、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならばDunnett法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば順位を利用したDunnett型の検定法により行った。

交尾率、受胎率および出産率は、 χ^2 検定により行った。

なお、病理組織学検査において、1000 mg/kg群で毒性学的影響が示唆され他の用量群についても検査を実施した雌における肝臓の髄外造血については、対照群との群間比較を上記の順位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。

結果

1. 反復投与毒性

1) 雄に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡および瀕死例は、いずれの群でも認められなかった。

一般状態観察において、いずれの群とも異常はみられなかった。

(2) 体重推移 (Fig. 1)

各投与群とも、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

(3) 摂餌量 (Fig. 2)

各投与群とも、対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。

(4) 尿検査 (Table 1)

各投与群とも、対照群と比べて尿量および比重に有意差はみられなかった。

色調、pH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンおよび沈渣は、各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。

(5) 血液学検査 (Table 2)

各投与群とも、対照群と比べていずれの測定項目にも有意差は見られなかった。

(6) 血液生化学検査 (Table 3)

各投与群とも、対照群と比べていずれの測定項目にも有意差は見られなかった。

(7) 剖検

対照群では、左精巣上部尾部に黄白色結節が1例みられた。30, 100, 300および1000 mg/kgでは、いずれにも異常はみられなかった。

(8) 器官重量 (Table 4)

剖検日の体重において、各投与群とも対照群と比べて有意さはみられなかった。

器官重量において、各投与群とも対照群と比べていずれの絶対および相対重量にも有意差はみられなかった。

(9) 病理組織学検査 (Table 5)

脾臓：髄外造血が30 mg/kg群で3例、100 mg/kg群で4例、300 mg/kg群で3例、1000 mg/kg群で5例みられたが、それらの程度はいずれもごく軽度であり、投与量との関連が必ずしも明確ではないこと、髄外造血は対照群でも通常認められることから、偶発所見と考えられる。

その他には、心臓において組織球浸潤が、肺において出血が、肝臓において限局性の肝細胞壊死および微小肉芽腫が、腎臓において尿管管上皮硝子滴出現が、前立腺においてリンパ様細胞浸潤が、ハーダー腺においてリンパ様細胞浸潤がみられたが、これらの変化はいずれも偶発的変化と判断される。

2) 雌に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡および瀕死例は、いずれの群でも認められなかつ

た。

一般状態観察において、いずれの群とも異常はみられなかった。

(2) 体重推移 (Fig. 3)

交配開始前、妊娠期間および哺育期間において、各投与群とも対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

(3) 摂餌量 (Fig. 4)

交配開始前および妊娠期間において、各投与群とも対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。

哺育期間中において、30, 100および300 mg/kg群では対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて哺育4日に摂餌量の有意な高値がみられた。

(4) 剖検

いずれの群とも異常はみられなかった。

(5) 器官重量 (Table 6)

剖検日の体重において、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、各投与群とも対照群と比べていずれの絶対および相対重量にも有意差はみられなかった。

(6) 病理組織学検査 (Table 7)

肝臓：髄外造血が1000 mg/kg群で2例みられた。

その他には、肝臓において肝細胞広範壊死、限局性の肝細胞壊死および微小肉芽腫が、脾臓において髄外造血が、腎臓において尿管管空胞化およびリンパ様細胞浸潤が、膀胱において潰瘍、粘膜固有層における出血および粘膜固有層におけるリンパ様細胞浸潤がみられたが、これらの変化は対照群でも通常観察される変化であること、あるいは対照群でのみ認められている変化であること、もしくはそれらの程度は対照群と比べて差がないことから、偶発的変化と判断される。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

(1) 発情回数、交尾率および受胎率 (Table 8)

交配前の投与期間(14日間)の発情回数は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

交尾所要日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

未交尾の組み合わせは対照群で1組みられたのみで、交尾率には各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。

不受胎雌は30 mg/kg群で1例みられたが、受胎率には各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。

(2) 妊娠期間、分娩状態、妊娠黄体数、着床率および出産率 (Table 9)

妊娠期間は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。母動物の分娩状態において、いずれの群とも異常はみられなかった。

各投与群とも、対照群と比べて妊娠黄体数、着床数および着床率に有意差はみられなかった。

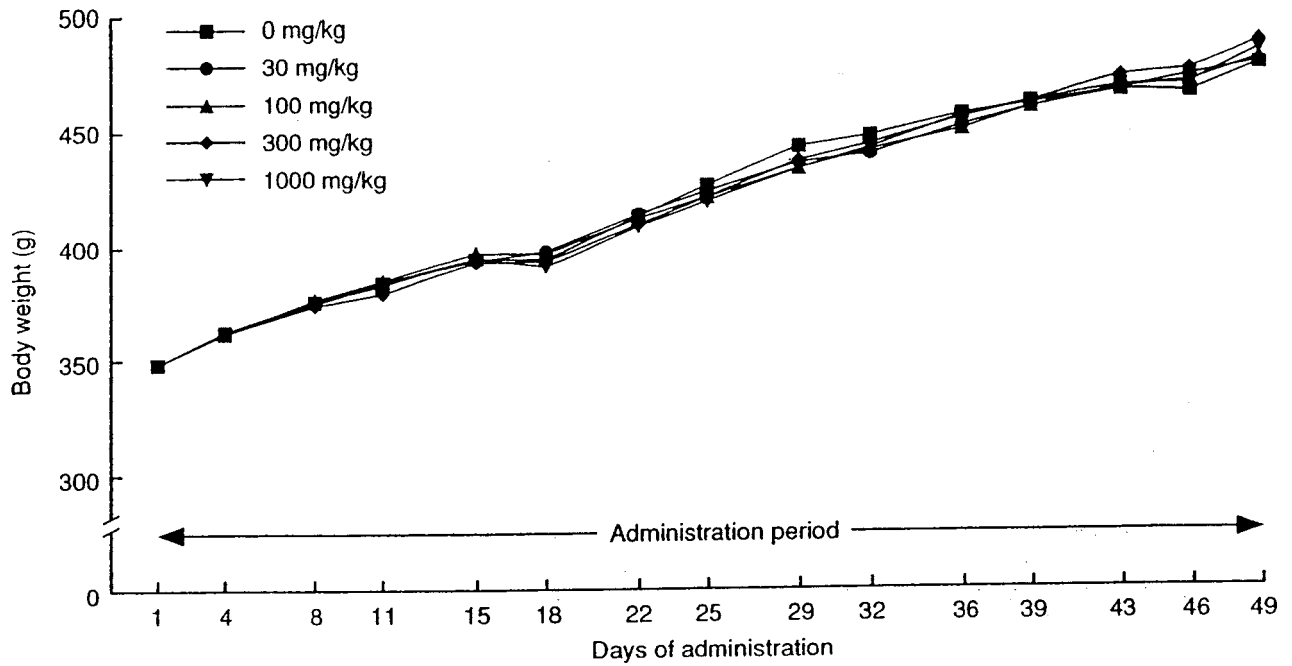


Fig. 1 Body weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

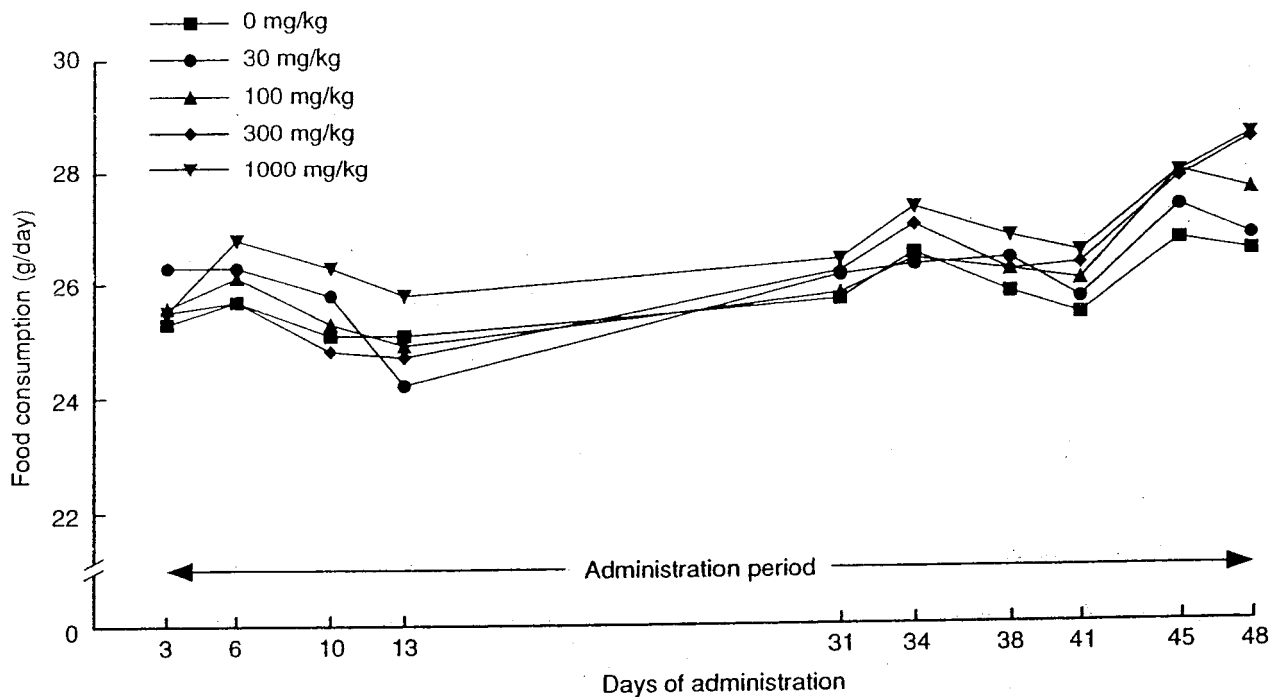


Fig. 2 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

出産率は、いずれの群とも100%であった。哺育状態において、いずれの群とも異常はみられなかった。

2) 児動物に及ぼす影響

(1) 分娩率および出生率 (Table 9)

各投与群とも、対照群と比べて総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、性比、分娩率、児の産出率および出生率に有意差はみられなかった。

(2) 児動物の一般状態および生存率 (Table 9)

各投与群とも、対照群と比べて哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率に有意差はみられなかった。

新生児の外表観察では、いずれの群とも異常はみられなかった。死産児においては、300 mg/kg群で象鼻症が1例みられたが、その他の投与群においては認められなかったことから、偶発例と考えられる。

児動物の一般状態では、いずれの群とも異常はみられ

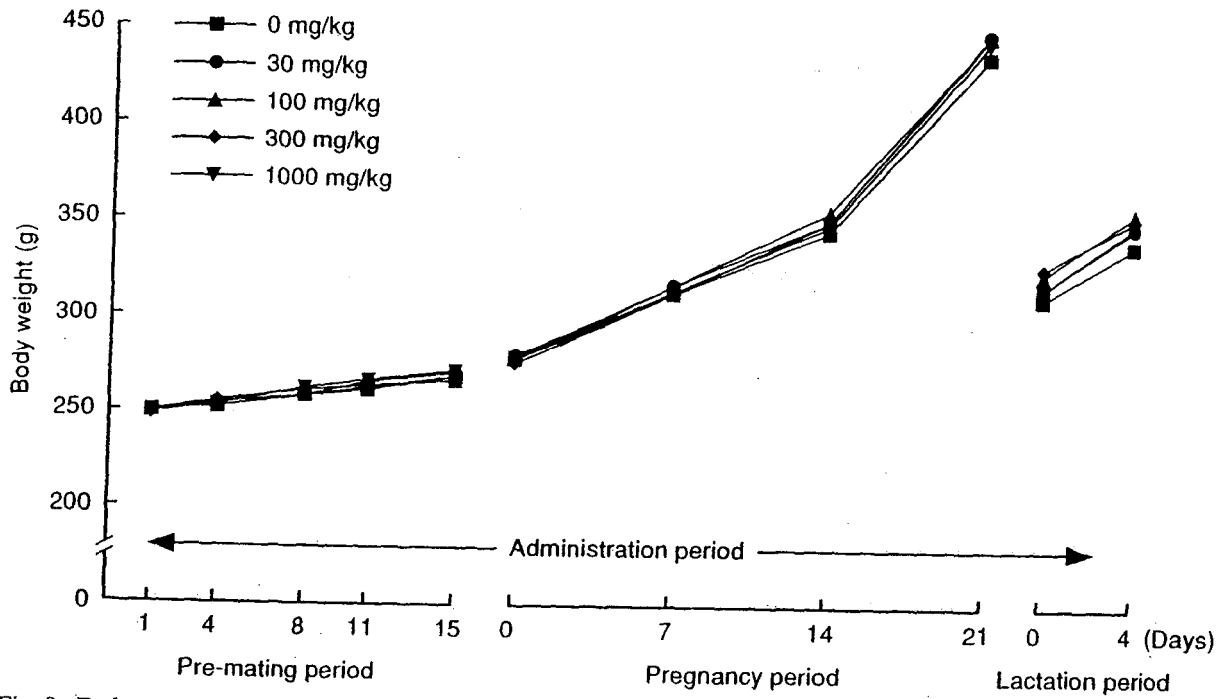


Fig. 3 Body weight of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

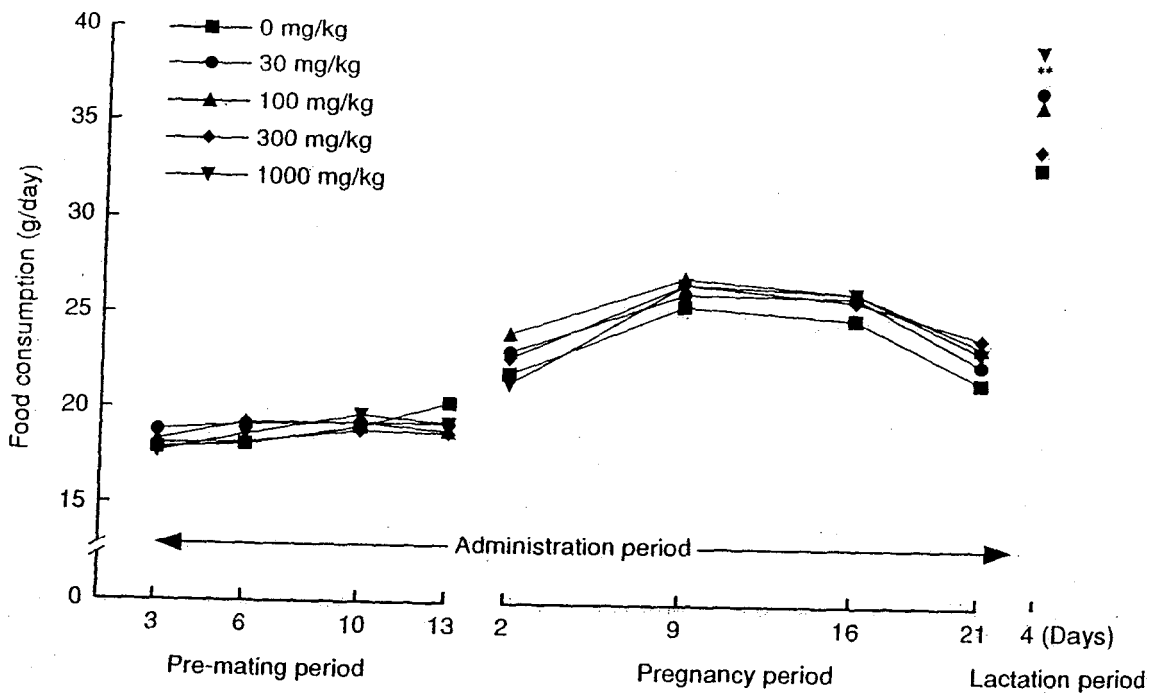


Fig. 4 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Significantly different from control (** $p < 0.01$)

なかった。

(3) 児動物の体重推移 (Table 9)

各投与群とも、対照群と比べて哺育0および4日の雌雄別体重に有意差はみられなかった。

(4) 児動物の剖検

いずれの群とも、異常はみられなかった。

考察

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに、雌雄親動物の生殖能力および児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討し

た。

雄に関しては、死亡および瀕死例はいずれの群にも認められなかった。また、観察期間を通して一般状態、体重および摂餌量に投与による影響はみられなかった。投与期間終了時の尿検査、血液学検査および血液生化学検査においても、投与による影響は認められなかった。また、剖検所見、器官重量および病理組織学的検査にも投与による影響は認められなかった。

雌に関しては、死亡および瀕死例はいずれの群にも認められなかった。また、観察期間を通して一般状態および体重に投与による影響はみられなかった。なお、1000 mg/kg群で哺育期に摂餌量の一過性の高値がみられたが、体重推移に異常の認められない変化であり、1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンによる影響とは考えられない。また、剖検所見および器官重量にも投与による影響は認められなかった。病理組織学検査において、1000 mg/kg群で肝臓に髓外造血が2例みられた。しかし、他の器官・組織に病理組織学変化は認められないこと、髓外造血は2例でごく軽度に認められているのみであることから、軽微な変化と考えられる。

親動物の生殖発生に対しては、前述したように1000 mg/kg群でも、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膈および乳腺に病理組織学変化は認められなかった。また、発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎率、妊娠黄体数、着床数、着床率、出産率、妊娠期間、分娩状態および哺育状態では、投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

児動物に対しては、総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、性比、分娩率、児の産出率、出生率、哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率に投与に起因すると思われる変化はみられなかった。新生児の外表観察において、投与に起因する異常はみられなかった。児動物の体重では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。児動物の剖検では、いずれの群とも異常はみられなかった。

以上のように、1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-トリオンの一般毒性学的無影響量は、雄では1000 mg/kg投与しても毒性学的影響が認められなかったことから1000 mg/kg/dayと考えられる。また、雌では1000 mg/kg投与により肝臓に髓外造血が認められたことから300 mg/kg/dayと考えられる。生殖発生毒性学的な無影響量は、1000 mg/kg投与しても雌雄親動物、児動物とも影響は認められなかったことからいずれも1000 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 古橋忠和ほか、未公刊。

連絡先

試験責任者：古橋忠和
 試験担当者：三輪芳久，長瀬孝彦，牧野浩平，
 内藤一嘉，木村 均，岡田雅昭
 (株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
 〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6-104
 Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)
 Yoshihisa Miwa, Takahiko Nagase,
 Kohei Makino, Kazuyoshi Naito,
 Hitoshi Kimura and Masaaki Okada
 Nihon Bioresearch Inc.
 6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-
 6251, Japan
 Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

Table 1 Urinary examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	12
Volume (mL) : Mean±S.D.	14.69 ± 6.20	19.23 ± 5.21	18.92 ± 3.65	15.20 ± 3.55	14.59 ± 6.74
Specific gravity: Mean±S.D.	1.0525 ± 0.0175	1.0495 ± 0.0120	1.0471 ± 0.0084	1.0568 ± 0.0097	1.0598 ± 0.0129
Color					
Light yellow	12	12	12	12	12
pH					
7.0	0	0	0	0	1
7.5	1	0	1	1	0
8.0	1	1	4	1	1
8.5	7	8	5	4	7
9.0	3	3	2	6	3
Protein					
Negative	0	1	2	0	0
10~20 mg/dL	2	5	4	3	0
30 mg/dL	5	4	3	2	7
100 mg/dL	5	2	3	7	5
Glucose					
Negative	12	12	12	12	12
Ketone body					
Negative	7	11	11	5	2
Slight	5	1	1	7	10
Bilirubin					
Negative	12	12	12	12	12
Occult blood					
Negative	11	10	11	12	11
Trace	0	2	0	0	1
Slight	0	0	1	0	0
Marked	1	0	0	0	0
Urobilinogen					
Normal	12	12	12	12	12
Urinary sediments					
Epithelial cells					
0~20 cells/100 fields	10	12	10	9	11
21~100 cells/100 fields	2	0	2	3	1
Erythrocytes					
0~20 cells/100 fields	11	11	12	12	12
21~100 cells/100 fields	0	1	0	0	0
201~500 cells/100 fields	1	0	0	0	0
Leukocytes					
0~20 cells/100 fields	12	12	12	12	12
Casts					
Not observed	12	12	12	12	12
Crystals					
Not observed	6	5	7	4	5
Observed	6	7	5	8	7

Table 2 Hematological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)		0	30	100	300	1000
Number of males		12	12	12	12	12
RBC	(10 ⁶ /μL)	848.3 ± 47.3	849.1 ± 43.7	843.3 ± 35.9	835.7 ± 32.0	836.7 ± 53.8
Hemoglobin	(g/dL)	15.46 ± 0.48	15.67 ± 0.77	15.54 ± 0.66	15.35 ± 0.58	15.39 ± 0.69
Hematocrit	(%)	46.00 ± 1.72	46.90 ± 2.62	46.36 ± 2.29	45.56 ± 1.84	45.82 ± 2.66
MCV	(μm ³)	54.30 ± 1.42	55.27 ± 1.44	55.00 ± 1.95	54.54 ± 1.77	54.81 ± 1.55
MCH	(pg)	18.25 ± 0.69	18.45 ± 0.59	18.44 ± 0.61	18.37 ± 0.69	18.43 ± 0.62
MCHC	(g/dL)	33.61 ± 0.53	33.41 ± 0.40	33.55 ± 0.42	33.70 ± 0.48	33.62 ± 0.56
Platelet	(10 ⁴ /μL)	101.75 ± 11.94	99.74 ± 9.39	100.69 ± 6.93	95.00 ± 6.38	106.54 ± 8.76
Reticulocyte	(%)	27.0 ± 4.6	28.0 ± 4.8	26.5 ± 5.8	27.1 ± 4.8	25.4 ± 3.8
PT	(sec.)	20.98 ± 4.17	19.96 ± 3.97	20.94 ± 4.79	20.33 ± 3.10	20.80 ± 4.97
APTT	(sec.)	32.61 ± 4.55	30.71 ± 2.17	31.57 ± 3.51	31.62 ± 2.70	32.49 ± 4.50
Fibrinogen	(mg/dL)	227.5 ± 22.7	228.0 ± 16.4	226.5 ± 17.6	228.3 ± 9.1	217.2 ± 15.8
WBC	(10 ³ /μL)	70.8 ± 18.4	68.2 ± 15.6	62.9 ± 15.6	67.1 ± 18.3	66.8 ± 19.4
Differential leukocyte (%)						
Lymphocyte		91.4 ± 4.4	91.5 ± 3.8	91.0 ± 4.9	90.7 ± 4.1	90.8 ± 5.2
Neutrophil		7.4 ± 4.0	7.5 ± 4.0	8.4 ± 4.7	8.4 ± 3.6	8.4 ± 4.9
Eosinophil		0.8 ± 0.8	0.5 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.6 ± 1.2	0.3 ± 0.7
Basophil		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Monocyte		0.4 ± 0.5	0.5 ± 0.8	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.7	0.5 ± 0.5

Each value shows mean±S.D.

Table 3 Blood chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)		0	30	100	300	1000
Number of males		12	12	12	12	12
AST	(IU/L)	90.47 ± 16.03	93.92 ± 14.12	98.22 ± 16.70	90.08 ± 15.70	90.06 ± 12.32
ALT	(IU/L)	30.65 ± 5.19	32.22 ± 6.11	33.33 ± 6.61	30.48 ± 2.54	30.33 ± 5.39
ALP	(IU/L)	346.93 ± 70.40	316.90 ± 46.91	312.46 ± 46.92	346.17 ± 69.79	303.48 ± 46.26
γ-GTP	(IU/L)	1.133 ± 0.217	1.254 ± 0.166	1.179 ± 0.163	1.104 ± 0.176	1.106 ± 0.110
T-protein	(g/dL)	5.34 ± 0.17	5.35 ± 0.17	5.33 ± 0.19	5.38 ± 0.13	5.28 ± 0.24
Albumin	(g/dL)	2.718 ± 0.135	2.711 ± 0.083	2.718 ± 0.082	2.738 ± 0.086	2.698 ± 0.105
A/G ratio		1.038 ± 0.074	1.031 ± 0.068	1.044 ± 0.044	1.037 ± 0.051	1.049 ± 0.067
T-bilirubin	(mg/dL)	0.127 ± 0.023	0.119 ± 0.018	0.124 ± 0.019	0.119 ± 0.025	0.128 ± 0.024
BUN	(mg/dL)	17.43 ± 1.63	18.13 ± 1.06	17.59 ± 1.67	17.07 ± 1.21	19.24 ± 2.80
Creatinine	(mg/dL)	0.275 ± 0.025	0.270 ± 0.029	0.264 ± 0.024	0.263 ± 0.023	0.259 ± 0.024
Glucose	(mg/dL)	114.68 ± 11.91	114.03 ± 9.29	112.98 ± 8.28	114.37 ± 8.60	113.81 ± 9.29
T-Cholesterol	(mg/dL)	51.62 ± 10.80	56.73 ± 11.50	49.73 ± 15.49	56.21 ± 11.91	49.32 ± 8.92
Triglyceride	(mg/dL)	32.33 ± 15.68	32.94 ± 12.43	31.44 ± 12.99	41.11 ± 8.44	38.60 ± 17.56
Na	(mEq/L)	146.53 ± 1.11	146.23 ± 0.90	146.34 ± 1.25	145.98 ± 1.15	146.20 ± 1.76
K	(mEq/L)	4.453 ± 0.163	4.550 ± 0.180	4.572 ± 0.217	4.532 ± 0.189	4.527 ± 0.203
Cl	(mEq/L)	107.96 ± 0.88	107.52 ± 0.87	107.72 ± 1.50	107.57 ± 1.04	107.53 ± 1.40
Ca	(mg/dL)	9.16 ± 0.27	9.14 ± 0.21	9.18 ± 0.29	9.18 ± 0.21	9.14 ± 0.19
Inorganic-p	(mg/dL)	7.34 ± 0.56	7.41 ± 0.46	7.41 ± 0.55	7.53 ± 0.51	7.77 ± 0.79

Each value shows mean±S.D.

Table 4 Organ weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)		0	30	100	300	1000
Number of males		12	12	12	12	12
Body weight	(g)	455.8±27.1	455.3±24.8	453.8±25.3	463.8±25.3	461.3±28.6
Brain	(g)	2.072±0.087	2.121±0.086	2.068±0.070	2.094±0.076	2.082±0.073
	(g%)	0.456±0.033	0.468±0.028	0.457±0.026	0.453±0.025	0.453±0.031
Pituitary	(mg)	14.12±1.96	14.63±1.25	13.98±1.17	14.28±1.67	13.81±2.06
	(mg%)	3.09±0.40	3.22±0.23	3.09±0.23	3.08±0.30	2.99±0.50
Thyroids	(mg)	19.40±3.82	19.34±3.89	18.60±1.93	20.57±3.74	18.25±3.97
	(mg%)	4.26±0.83	4.23±0.67	4.12±0.53	4.43±0.79	3.99±0.94
Thymus	(mg)	310.96±78.25	317.95±91.18	268.24±47.59	336.78±65.34	287.72±63.50
	(mg%)	67.98±16.47	69.88±19.86	59.38±11.74	72.55±13.18	62.48±14.06
Heart	(g)	1.367±0.128	1.480±0.127	1.435±0.198	1.451±0.111	1.440±0.143
	(g%)	0.298±0.031	0.324±0.022	0.315±0.032	0.314±0.032	0.313±0.026
Liver	(g)	10.939±0.947	11.758±1.310	11.519±1.316	11.658±0.949	11.926±1.672
	(g%)	2.399±0.096	2.580±0.184	2.533±0.174	2.515±0.151	2.578±0.248
Spleen	(g)	0.736±0.099	0.798±0.111	0.821±0.138	0.767±0.096	0.792±0.121
	(g%)	0.161±0.021	0.175±0.020	0.182±0.026	0.166±0.017	0.172±0.022
Kidneys	(g)	2.944±0.226	3.003±0.229	3.062±0.247	3.063±0.198	3.079±0.304
	(g%)	0.649±0.053	0.660±0.035	0.673±0.048	0.662±0.040	0.668±0.058
Adrenals	(mg)	54.02±7.21	57.68±8.79	57.93±6.62	55.82±6.31	54.40±6.64
	(mg%)	11.90±1.76	12.66±1.64	12.78±1.50	12.05±1.32	11.83±1.65
Testes	(g)	3.304±0.252	3.296±0.259	3.395±0.299	3.276±0.214	3.345±0.203
	(g%)	0.728±0.075	0.726±0.072	0.751±0.074	0.708±0.050	0.727±0.053
Epididymides	(g)	0.683±0.207	0.704±0.182	0.650±0.137	0.598±0.130	0.683±0.242
	(g%)	0.151±0.046	0.155±0.040	0.143±0.031	0.129±0.028	0.148±0.053

Each value shows mean±S.D.

Table 5 Histopathological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)	0				30				100				300				1000													
	N ^a	A ^b	±	+ 2+	3+	N	A	±	+ 2+	3+	N	A	±	+ 2+	3+	N	A	±	+ 2+	3+										
Findings																														
Heart	[12] ^c																[12]													
Cellular infiltration, histiocyte	8	4	4	0	0	0																	8	4	4	0	0	0		
Lung	[12]																[12]													
Hemorrhage	12	0																	11	1	1	0	0	0						
Liver	[12]																[12]													
Necrosis, focal, hepatocyte	11	1	1	0	0	0	12	0	[12]				12	0	[12]															
Microgranuloma	2	10	5	5	0	0	5	7	4	3	0	0	6	6	5	1	0	0	4	8	7	1	0	0	5	7	3	4	0	0
Spleen	[12]																[12]													
Hematopoiesis, extramedullary	12	0	[12]				9	3	3	0	0	0	8	4	4	0	0	0	9	3	3	0	0	0	7	5	5	0	0	0
Kidney	[12]																[12]													
Hyaline droplet, tubular epithelium	8	4	4	0	0	0																	8	4	4	0	0	0		
Prostate	[12]																[12]													
Cellular infiltration, lymphoid cell	6	6	4	2	0	0																	6	6	4	2	0	0		
Harderian gland	[12]																[12]													
Cellular infiltration, lymphoid cell	10	2	2	0	0	0																	12	0						

Grade of histopathological findings; ±:slight, +:mild, 2+:moderate, 3+:marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Number of males examined.

No remarkable changes were seen in the trachea, pancreas, salivary gland (sublingual and submandibular), esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, thymus, lymph node (submandibular and mesenteric), urinary bladder, testis, epididymis, seminal vesicle, pituitary, adrenal, thyroid, parathyroid, brain (cerebrum, cerebellum or medulla oblongata), spinal cord, sciatic nerve, eyeball, or bone marrow (sternum or femur).

Examined only for the liver and spleen in the 30, 100 and 300 mg/kg groups.

Table 6 Organ weight of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)		0	30	100	300	1000
Number of dams		11	11	12	12	12
Body weight	(g)	338.5±18.1	347.5±18.1	355.6±20.9	351.6±14.8	349.3±16.0
Brain	(g)	1.951±0.060	1.935±0.043	1.953±0.051	1.942±0.060	1.946±0.094
	(g%)	0.577±0.024	0.559±0.034	0.551±0.027	0.553±0.026	0.556±0.036
Pituitary	(mg)	22.21±3.15	22.18±2.42	23.19±3.27	24.33±2.77	22.71±2.63
	(mg%)	6.55±0.72	6.39±0.65	6.55±0.98	6.91±0.70	6.51±0.74
Thyroids	(mg)	19.29±3.97	19.05±2.17	21.77±3.78	18.00±2.57	18.20±2.80
	(mg%)	5.68±1.08	5.50±0.70	6.15±1.05	5.14±0.85	5.21±0.78
Thymus	(mg)	204.46±56.14	234.73±67.93	249.35±49.40	253.42±54.08	229.23±74.10
	(mg%)	60.08±15.52	67.53±19.22	70.53±15.69	72.08±15.26	65.40±20.19
Heart	(g)	1.044±0.103	1.066±0.081	1.119±0.076	1.088±0.099	1.049±0.058
	(g%)	0.308±0.026	0.306±0.016	0.314±0.016	0.309±0.030	0.301±0.023
Liver	(g)	13.284±1.104	13.268±1.437	13.570±2.264	13.538±1.284	13.304±1.209
	(g%)	3.931±0.369	3.817±0.340	3.824±0.625	3.852±0.323	3.815±0.369
Spleen	(g)	0.693±0.116	0.732±0.092	0.710±0.090	0.767±0.110	0.727±0.146
	(g%)	0.205±0.029	0.211±0.024	0.198±0.020	0.218±0.034	0.208±0.038
Kidneys	(g)	2.003±0.159	1.978±0.136	2.013±0.133	2.003±0.208	2.048±0.211
	(g%)	0.593±0.044	0.571±0.044	0.566±0.034	0.571±0.055	0.588±0.062
Adrenals	(mg)	75.63±7.99	83.82±9.39	83.48±14.63	79.03±8.28	78.52±12.25
	(mg%)	22.41±2.80	24.12±2.23	23.63±4.61	22.52±2.59	22.54±3.73
Ovaries	(mg)	108.93±11.30	107.25±14.76	106.13±11.32	106.07±11.27	103.23±11.14
	(mg%)	32.25±3.59	30.94±4.63	29.89±3.20	30.23±3.50	29.65±3.66

Each value shows mean±S.D.

Table 7 Histopathological findings of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)	0				30				100				300				1000																			
	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+												
Findings																																				
Liver	[12] ^c				[12]				[12]				[12]				[12]																			
Necrosis, massive, hepatocyte	12	0					11	1	0	1	0	0	12	0					12	0					12	0										
Necrosis, focal, hepatocyte	11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	0	0	10	2	2	0	0	0	12	0										
Microgranuloma	12	0					12	0					11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	0	0						
Hematopoiesis, extramedullary	12	0					12	0					12	0					12	0					10	2	2	0	0	0						
Spleen	[12]																[12]																			
Hematopoiesis, extramedullary	0	12	3	8	1	0																			2	10	1	5	4	0						
Kidney	[12]																[12]																			
Vacuolization, urinary tubule	11	1	1	0	0	0																								12	0					
Cellular infiltration, lymphoid cell	11	1	1	0	0	0																									10	2	2	0	0	0
Urinary bladder	[12]																[12]																			
Ulcer	11	1	1	0	0	0																											12	0		
Hemorrhage, propria	11	1	1	0	0	0																												12	0	
Cellular infiltration, lymphoid cell, propria	11	1	1	0	0	0																												12	0	

Grade of histopathological findings; ±:slight, +:mild, 2+:moderate, 3+:marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Number of females examined.

No remarkable changes were seen in the heart, lung, trachea, pancreas, salivary gland (sublingual and submandibular), esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, thymus, lymph node (submandibular and mesenteric), ovary, uterus, vagina, pituitary, adrenal, thyroid, parathyroid, brain (cerebrum, cerebellum, or medulla oblongata), spinal cord, sciatic nerve, eyeball, Harderian gland, bone marrow (sternum or femur), or mammary gland.

Examined only for the liver in the 30, 100, and 300 mg/kg groups.

Table 8 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of females	12	12	12	12	12
Number of estrous cases before mating (14 days)					
Mean±S.D.	3.6±0.5	3.1±0.9	3.4±0.7	3.4±0.5	3.3±0.9
Number of pairs	12	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	11	12	12	12	12
Copulation index (%) ^a	91.7	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of conceiving days					
Mean±S.D.	2.9±0.9	2.7±1.6	3.3±0.8	2.6±1.1	2.3±1.1
Conceiving days 1-5	11	11	12	12	12
Conceiving days ≥6	0	1	0	0	0
Number of pregnant females	11	11	12	12	12
Fertility index (%) ^b	100.0	91.7	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females with live pups	11	11	12	12	12

a) (Number of pairs with successful copulation/number of pairs)×100.

b) (Number of pregnant females/number of pairs with successful copulation)×100.

Table 9 Observation of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-trione by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of dams	12	12	12	12	12
Length of gestation (days)	22.45±0.52	22.27±0.47	22.25±0.45	22.08±0.29	22.25±0.45
Corpora lutea	18.2±2.5	18.3±3.2	17.0±2.0	17.0±2.6	18.4±3.4
Implantation scars	15.6±2.5	16.8±3.2	15.6±1.6	15.7±1.9	16.2±1.6
Implantation index (%) ^a	86.5±12.9	92.2±9.4	92.0±7.3	92.8±6.9	89.4±11.0
Gestation index (%) ^b	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Pups born	14.7±3.0	15.9±3.3	14.8±1.6	14.8±1.7	15.8±1.3
Stillbirths	0.3±0.6	0.1±0.3	0.4±1.2	0.3±0.5	0.2±0.4
Live pups born	14.5±2.8	15.8±3.2	14.3±2.1	14.4±1.7	15.6±1.2
Sex ratio ^c	1.15±0.68	1.25±0.67	1.08±0.50	0.91±0.37	1.28±1.06
Delivery index (%) ^d	93.5±7.8	94.5±6.6	94.8±4.5	94.3±5.1	97.7±2.9
Birth index (%) ^e	92.1±8.1	94.1±7.0	92.2±10.2	92.3±5.6	96.6±3.8
Live birth index (%) ^f	98.5±3.8	99.5±1.5	97.1±8.4	97.8±3.3	98.9±2.5
Live pups on day 4 of lactation	14.4±2.9	15.6±3.1	14.3±2.1	14.3±1.8	15.3±1.2
Viability index (%) ^g	99.3±2.4	98.9±2.4	99.4±2.0	98.8±2.9	98.5±3.7
External anomalies (%) ^h	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Body weight of pups (g)					
Male Day 0	6.87±0.55	6.69±0.42	6.74±0.58	6.73±0.38	6.87±0.38
4	10.93±1.50	10.74±1.20	11.14±1.38	10.99±1.04	10.93±0.86
Female Day 0	6.54±0.70	6.28±0.41	6.48±0.52	6.35±0.33	6.42±0.34
4	10.39±1.68	10.08±1.07	10.63±1.37	10.43±1.09	10.45±0.65

Each value shows mean±S.D. per dam.

a) (Number of implantation scars/number of corpora lutea)×100.

c) Number of male pups born/number of female pups born.

e) (Number of live pups born/number of implantation scars)×100.

g) (Number of live pups on day 4/number of live pups born)×100.

b) (Number of dams with live pups/number of pregnant dams)×100.

d) (Number of pups born/number of implantation scars)×100.

f) (Number of live pups born/number of pups born)×100.

h) (Number of pups with external anomalies/number of live pups)×100.