

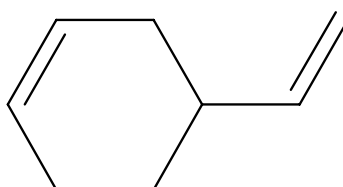
4-Vinyl-1-cyclohexene

4-ビニル-1-シクロヘキセン

[CAS No. 100-40-3]

Molecular formula: C₈H₁₂

Molecular weight: 108.18



ABSTRACT

1. Material and method

Purity	: 99.8%
Test species/strain	: Rat/CrI:CD(SD)
Test method	: OECD Test Guideline 422
Route	: Oral (gavage)
Dosages	: 0, 2, 20, 200 mg/kg
Dosages for recovery	: 0, 200 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 12 (5 for recovery); females, 12; satellite females, 5
Vehicle	: Olive oil
Administration period	: Males, 42 days Females, from 14 days before mating to day 4 of lactation Females (satellite), 42 days
Recovery period	: Males, 14 days Females (satellite), 14 days
Terminal killing	: Males, day 43 of treatment and 15 of recovery Females, day 5 of lactation Females (satellite), day 15 of recovery Offspring, day 4 after birth
GLP	: Yes

2. Results

Repeated dose toxicity

The effects of the test substance were observed in the stomachs of some animals. On necropsy, a recessed region in the mucosa of the forestomach and a blackish region in the mucosa of the glandular stomach were observed in females given 200 mg/kg. Histological examination revealed diffuse hyperplasia of the squamous epithelium and ulcers of the forestomach in females given 200 mg/kg.

Decreased spontaneous movements were observed in males given 200 mg/kg. Salivation related to irritation by the test substance was observed in males given 2 mg/kg or more and in females given 200 mg/kg.

No effects were observed in the detailed clinical observation, reflex/reaction, body weight, food consumption, hematology, blood chemistry or organ weights.

No abnormal signs like decreased spontaneous movements or stomach lesions were observed after the 14-day recovery period.

Reproductive and developmental toxicity

The test substance had no effects on the estrous cycle, reproductive ability, delivery dam index, deliveries or nursing condition. No effect of the test substance was observed on live birth index, viability index, sex ratio or body weight of pups. No external abnormalities were noted in any pup.

3. Evaluation

It was concluded from the above results that the No-Observed-Adverse-Effect Level (NOAEL) of the repeated dose toxicity of 4-vinyl-1-cyclohexene was 20 mg/kg/day for males and females based on decreased spontaneous movement in males and the changes in the stomach in females given 200 mg/kg, and that the NOAEL of the reproductive/developmental toxicity was 200 mg/kg/day for parental animals and offspring based on the absence of abnormalities in any groups.

The No-Observed-Effect Level (NOEL) of the repeated dose toxicity was less than 2 mg/kg/day for males and 20 mg/kg/day for females based on salivation in males given 2 mg/kg or more and females given 200 mg/kg, and that the NOEL of the reproductive/developmental toxicity was 200 mg/kg/day.

4-ビニル-1-シクロヘキセ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 Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of
4-Vinyl-1-cyclohexene by Oral Administration in Rats

要約

4-ビニル-1-シクロヘキセンについて 0, 2, 20 及び 200 mg/kg/day の用量で 1 群雌雄各 12 匹の CrI:CD(SD)ラットを用い、OECD テストガイドライン 422 に準じて反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。被験物質を交配開始 2 週間前から雄は 42 日間、雌は分娩後哺育 4 日まで経口投与し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖毒性、次世代に対する発生毒性について検討した。また、媒体対照群及び 200 mg/kg 群では、雄の 5 匹と雌のサテライト群の 5 匹を回復群として、投与後 14 日間の休薬による影響の可逆性についても検討した。なお、雌の回復群はテストガイドラインに準じて交配を実施しなかった。

1. 反復投与毒性

被験物質投与により胃に対する影響が示唆された。すなわち剖検において、雌の 200 mg/kg 群で前胃の粘膜陥凹部、腺胃の粘膜黒色部がみられた。病理組織学的検査においては、雌の 200 mg/kg 群で前胃の扁平上皮のびまん性過形成及び潰瘍がみられた。

このほか雄の 200 mg/kg 群で自発運動低下、雄の 2 mg/kg 以上の群及び雌の 200 mg/kg 群で被験物質の刺激性に起因する流涎がみられた。

回復期間終了時に、胃の変化及び自発運動低下は認められなかった。

詳細観察、機能検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量に被験物質投与の影響はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

親動物の性周期、生殖能力、出産率、分娩及び哺育状態並びに児動物の出生率、生存率、性比、外表及び体重のいずれにも被験物質投与に起因する変化はみられなかった。

以上より、本試験条件下における 4-ビニル-1-シクロヘキセンの反復投与毒性に関する無毒性量(NOAEL)は、雄の 200 mg/kg 群で自発運動低下、雌の 200 mg/kg 群で前胃の粘膜陥凹部、腺胃の粘膜黒色部、前胃の扁平上皮のびまん性過形成及び潰瘍がみられたことから、雌雄ともに 20 mg/kg/day と判断した。生殖発生毒性に関する NOAEL は、親動物、児動物ともに異常がみられないことから、最高用量である 200 mg/kg/day と判断した。

一方、反復投与毒性に関する無影響量(NOEL)は、雄の 2 mg/kg 以上の群及び雌の 200 mg/kg 群で刺激性に起因する流涎がみられたことから、雄は 2 mg/kg/day 未満、雌は 20 mg/kg/day と

判断した。生殖発生毒性に関する NOEL は、親動物、児動物ともに異常がみられないことから、200 mg/kg/day と判断した。

方法

1. 被験物質

4-ビニル-1-シクロヘキセン(ロット番号 GL01, 純度 99.8%)は、常温における性状は無色の液体である。入手後、冷暗所で保管した。被験物質の安定性は、投与開始前と投与期間終了後に赤外吸収スペクトルを測定することにより、投与期間中安定であることを確認した。投与液の調製は、被験物質にオリブ油(フジミ製薬所)を加えて高用量の投与液を懸濁させた。低用量及び中用量は、高用量から希釈調製した。調製液中の被験物質の均一性及び安定性を、ガスクロマトグラフィーを用いて測定し、14 日間安定であることを確認した。投与液は、投与まで冷暗所に保管し、14 日以内に使用した。また、投与開始時に投与液中の被験物質濃度を確認した。

2. 使用動物及び飼育環境条件

日本チャールス・リバー(日野飼育センター)で生産された 8 週齢の CrI:CD(SD)ラット(SPF)の雌 65 匹、雄 55 匹を購入し、6 日間の検疫を含む 8 日間の馴化を行った。投与開始 2 日前に体重層別無作為抽出法により、各群の平均体重がほぼ等しくなるように群分けした。投与開始時の動物の週齢は雌雄とも 9 週齢で、体重範囲は、雄が 315.0～364.7 g、雌が 198.9～235.3 g であった。

動物は、検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通して、温度 21～25℃、相対湿度 40～70%、換気回数 10～15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔(7 時点灯、19 時消灯)に設定したバリアシステムの飼育室で、ステンレス製金網床ケージに個別飼育した。交配期間中は雌雄各 1 匹とし、交尾の成立した雌は、妊娠 17 日から絶食日の前日まで床敷(サンフレック、日本チャールス・リバー)入りポリカーボネイト製平床ケージに収容し、分娩後は児動物と同居させた。動物には、オートクレーブ滅菌した飼料(固型飼料、MF、オリエンタル酵母工業)及び塩素添加した水道水を自由に摂取させた。

3. 投与量の設定及び投与方法

投与用量は、14 日間反復投与毒性試験の結果をもとに決定した。すなわち、被験物質を 0, 25, 250, 500 及び 1,000 mg/kg/day の用量で、1 群雌雄各 3 匹の CrI:CD(SD)ラットに 14 日間反復経口投与した。その結果、雌雄の 250 mg/kg 以上の群で流涎、雄の 250 mg/kg 以上の群及び雌の 500 mg/kg 以上の群で自発運動低下及び呼吸数減少がみられた。さらに雌雄の 1,000 mg/kg 群でラッセル音、紅涙、ひきずり歩行、雄の同群で横臥位、円背位、うずくまり、易刺激性、震戦、つま先歩行、雌であえぎ呼吸、よろめき歩行などがみられたため、投与 5 日に全例を切

迫屠殺した。剖検においては、雄の 500 mg/kg 群で腺胃の粘膜黒色物付着、雌の 500 mg/kg 以上の群で肝臓の絶対及び相対重量の増加、雌の 500 mg/kg 以上の群及び雄の 1,000 mg/kg 群で肝臓の腫大、雄の 1,000 mg/kg 群で腺胃の粘膜陥凹部、十二指腸の穿孔及び粘膜陥凹部などがみられた。したがって本試験の用量は、投与期間が長くなること及び妊娠分娩時の一般状態の悪化が予想されたため、高用量を 200 mg/kg/day とし、以下 20 及び 2 mg/kg/day の 3 用量を設定した。

投与は、ネラトンカテーテル(テルモ)を接続した注射筒(テルモ)を用い、体重 1 kg あたり 5 mL として一定の時間に、1 日 1 回(週 7 回)の頻度で行った。投与期間は、雄で交配開始 2 週間前から交配期間を通し解剖前日までの 42 日間、雌で交配開始 2 週間前から交配期間、妊娠期間及び授乳期間を通して解剖前日(分娩 4 日)までの計 41~48 日間とした。なお、分娩途中の雌動物は、分娩終了後に投与した。媒体対照回復群及び高用量回復群は、42 日間の投与後に 14 日間休薬させた。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査

1) 一般状態

雄については、投与開始日から解剖前日まで毎日 2 回観察した。雌については、投与開始日から分娩状況、哺育状態も含めて、分娩 4 日まで毎日 2 回及び分娩 5 日(解剖日)に 1 回観察した。回復期間は解剖前日まで毎日 1 回観察した。

2) 詳細観察

雌雄の全例について、投与開始前に 1 回、投与開始後は週 1 回盲検で観察し、スコアリングを行った。盲検は、乱数によりすべての動物を並び替え、検査用ラベルを用いて投与群が判別できない状態での検査とした。雌は、分娩 4 日にも検査し、検査日に 1 例のみの場合は盲検とはしなかった。

ケージから取り出す際の反応は、動物を保持するために手を近づけたり、あるいは保持するなど動物に外部刺激を与えた場合の動物の出し易さ及び発声を観察した。手にとっての詳細な観察は、筋緊張、体温低下、立毛、被毛の状態(汚れ、粗剛)、皮膚及び粘膜の色(蒼白、発赤、チアノーゼ)、眼の異常(流涙、眼球突出、瞳孔径)、流涎、分泌物を観察した。アリーナ内での行動の観察は、動物をアリーナ内に 1 分間以上において、姿勢、活動性、呼吸、眼瞼閉鎖、歩行状態、振戦・攣縮・痙攣、常同行動及び異常行動の有無を観察した。また、1 分間の排糞回数(糞の数)及び排尿回数(尿のプール数)を記録した。

3) 機能検査

雄は、動物番号の小さい順に各用量 5 匹について、投与最終週に検査した。雌は、分娩動物のうち、各用量の分娩日の近い 5 匹について、解剖前日(分娩 4 日)の絶食前に検査した。回復群については、雌雄とも投与最終週に検査した。回復期間中の検査は、投与期間中に異常がみ

られなかったため行わなかった。

反応性検査は、検査対象となる感覚器に適切な外部刺激を与えたときの動物の反応を観察し、スコアリングを行った。検査は詳細観察に引き続き盲検で行った。視覚(接近・触覚)は、顔面前 3 cm に丸い棒等を近づけ、4 秒間そのまま保持したときの反応を記録した。聴覚は、頭上で指を鳴らしたときの反応を記録した。痛覚は、洗濯バサミで尾の 1/3 尾根部側を挟んだときの反応を記録した。瞳孔反射は、光を遮った状態で、ペンライトの光を当てたときの瞳孔反応を記録した。空中正向反射は、動物の腹部を上に向けた状態で約 30 cm の高さから落としたときの反応を記録した。

握力測定は、握力メータ(Grip strength meter, コロンバス)を用いて盲検で測定した。前肢、後肢とも 2 回測定し、その平均値を個体の前肢及び後肢の握力値とした。

自発運動量測定は、自発運動測定装置(SCANET : MV-10, メイティス)を用いて、動物の運動量を測定した。赤外線ビームを横切った数を測定値とし、1 時間(10 分間隔での 6 回)測定した。

4) 体重

雌雄とも馴化期間は、週 1 回及び群分け日に測定した。群分け後は、雄については投与 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 及び 43 日目(搬出時・絶食状態)、雌については投与 1, 3, 7 及び 14 日目、妊娠期間は妊娠 0, 7, 14, 17 及び 20 日、分娩後は 0 (分娩日)、4 及び 5 日(搬出時・絶食状態)に測定した。サテライトの雌の回復群は交配を行わないため、雄と同じ日に測定した。回復期間中は、雌雄とも回復 1, 3, 7, 14 及び 15 日目(搬出時・絶食状態)に測定した。

5) 摂餌量

雄については、投与 1, 3, 7, 14, 28, 35 及び 42 日目、雌については、妊娠前は投与 1, 3, 7 及び 14 日目、妊娠期間は妊娠 0, 7, 14, 17 及び 20 日、分娩後は 0 (分娩日)及び 4 日に測定した。サテライトの雌の回復群は投与 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35 及び 42 日目に測定した。回復期間中は、雌雄とも回復 1, 3, 7 及び 14 日目に測定した。雌雄とも各期間について、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均 1 日摂餌量を算出した。

6) 血液学的検査

投与期間終了時及び回復期間終了時に 1 晩絶食(16~20 時間)させた後、雄は各用量の生存動物のうち動物番号の小さい 5 匹、雌は各用量とも分娩日の近い 5 匹及び回復群の全例について、EDTA-2K を抗凝固剤として採血し、全自動総合血液学分析装置(CELL-DYN3500, アボットラボラトリーズ)により、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)及び血小板数(Platelet)を測定した。また、総合血液学検査装置(ADVIA 120, バイエル メディカル)により、網状赤血球数比率(Reticulo)及び白血球百分率(Differentiation of

leukocyte)を測定した。さらに 3.2%クエン酸ナトリウム水溶液を抗凝固剤として採血し、得られた血液より分離した血漿を用いて、血液凝固自動測定装置(KC-10A, アメルング)により、プロトロンビン時間(PT)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した。

7) 血液生化学的検査

血液学的検査を実施した動物について、採取した血液から分離した血清を用いて、生化学自動分析装置(7150, 日立製作所)により、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT), コリンエステラーゼ(ChE), 総蛋白(T-Protein), アルブミン(Albumin)及び総ビリルビン(T-Bil)を測定した。また、生化学自動分析装置(7170, 日立製作所)により、アルカリ性フォスファターゼ(ALP), γ -グルタミルトランスペプチターゼ(γ -GTP), 総コレステロール(T-Cho), トリグリセリド(TG), 血糖(Glucose), 尿素窒素(BUN), クレアチニン(Creatinine), カルシウム(Ca)及び無機リン(IP)を測定した。さらに電解質分析装置(PVA- α III, A & T)により、ナトリウム(Na), カリウム(K)及び塩素(Cl)を測定した。A/G 比(A/G ratio)は、総蛋白及びアルブミンより算出した。

8) 剖検

全例について、投与期間終了時(回復群は除く)及び回復期間終了時に、体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔、骨盤腔とその内容の観察を含む肉眼的観察を行った。卵巣については、妊娠黄体数を算出し、子宮は切開して着床痕数を記録した。

9) 器官重量及び組織採取

全例について、気管及び肺、胃、腸(十二指腸～直腸, パイエル板を含む), 肝臓, 心臓, 腎臓, 膀胱, 精巣, 精巣上体, 前立腺, 精嚢, 卵巣, 子宮, 膣, 脳(大脳, 小脳及び橋を含む), 脊髄, 坐骨神経, 骨髓(大腿骨), リンパ節(腋窩及び腸間膜リンパ節), 脾臓, 胸腺, 下垂体, 甲状腺(上皮小体を含む)及び副腎を採取し、肝臓, 心臓, 腎臓, 精巣, 精巣上体, 脳, 脾臓, 胸腺及び副腎の重量を測定した。また、搬出時の体重をもとに、器官の相対重量を算出した。肉眼的病変部として、20 mg/kg 群の雌 1 例の眼球及び非妊娠の雌 1 例の皮膚を採取した。気管、肺及び膀胱は、10%中性緩衝ホルマリン液を注入後採取した。胃及び腸は、10%中性緩衝ホルマリン液を注入した後、同液に浸漬し、その後内容物を水洗除去した。採取した器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。ただし精巣及び精巣上体はブアン液で固定した。

10) 病理組織学的検査

雄は媒体対照群及び 200 mg/kg 群の動物番号の小さい順に各群 5 匹、雌は分娩動物のうち分娩日の近い各群 5 匹について、気管、肺、胃、腸(十二指腸～直腸, パイエル板を含む), 肝臓, 心臓, 腎臓, 膀胱, 精巣, 精巣上体, 前立腺, 精嚢, 卵巣, 子宮, 膣, 脳(大脳, 小脳及び橋を含む), 脊髄, 坐骨神経, 骨髓(大腿骨), 腋窩リンパ節, 腸間膜リンパ節, 脾臓, 胸腺, 下垂体,

甲状腺(上皮小体を含む)及び副腎を検査した。心臓、腎臓及び肝臓については、200 mg/kg 群で被験物質投与の影響を疑う変化がみられたため、雄の 2 及び 20 mg/kg 群の動物番号の小さい順に各群 5 匹及び回復群の心臓及び腎臓を、雌は分娩動物のうち分娩日の近い各群 5 匹及び回復群の心臓及び腎臓、さらに雌の回復群の肝臓を検査した。胃については、200 mg/kg 群で被験物質投与の影響を疑う変化がみられたため、雄は、2 及び 20 mg/kg 群の動物番号の小さい各群 5 匹及び回復群の腺胃を、雌は、分娩動物のうち分娩日の近い各群 5 匹及び回復群の前胃を検査した。胸腺及び副腎については、雌の 2 及び 20 mg/kg 群の分娩日の近い各群 5 匹及び回復群を検査した。交尾確認後 25 日を経ても分娩開始が確認されない雌については、不妊の原因を確認するため、卵巣、子宮及び膣を検査した。全腹児が死亡した母動物については、病態を確認するため、胃、肝臓、心臓、腎臓、胸腺及び副腎を検査した。このほか肉眼的病変部がみられた媒体対照回復群の雄 1 例の精巣上体、200 mg/kg 回復群の雌 1 例の膣を検査した。検査は、パラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後、光学顕微鏡的に行った。

このほか雄の腎臓において、好酸性小体及び硝子滴増加みられ、Alpha_{2u}-グロブリンとの関連を確認するため、媒体対照群、20 及び 200 mg/kg 群の各 1 例について、抗Alpha_{2u}-グロブリン抗体による免疫組織化学検査を行った。また、肝臓に肝細胞空胞化がみられたため、雌の媒体対照群の 1 例及び 200 mg/kg 群の 2 例についてオイル赤O染色及びPAS反応を行った。肝臓のオイル赤O染色及びPAS反応においては、媒体対照群ではオイル赤O染色及びPAS反応ともに肝細胞内に陽性物質はみられなかったが、200 mg/kg 群では肝細胞内に陽性物質がみられたことから、肝細胞内に脂肪及びグリコーゲンが蓄積しているものと考えた。腎臓の抗Alpha_{2u}-グロブリン抗体を用いた免疫組織化学検査においては、20 mg/kg 以上の群で好酸性小体増加及び硝子滴増加に一致して、抗Alpha_{2u}-グロブリン抗体陽性物質の増加がみられた。

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

1) 性周期検査

雌全例について、投与開始日から交尾確認日まで膣垢を一定の時間に採取し、ギムザ染色後、光学顕微鏡的に検査し、各発情期から次の発情期までの日数から平均性周期日数を算出した。

2) 生殖能力検査

投与 15 日目の午後に、回復群を除く雌を同一用量の雄のケージに移し、1 対 1 の割合で同居させた。以降 14 日間を限度として交尾が確認されるまで毎日同居させた。交配期間中は毎日交尾の確認を行い、膣栓又は膣垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠 0 日と定めた。得られた交配の結果から、交尾率： $(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100$ 、授精率： $(\text{雌を妊娠させた雄動物数} / \text{交尾雄動物数}) \times 100$ 、受胎率： $(\text{妊娠動物数} / \text{交尾雌動物数}) \times 100$ 、交尾所要日数、着床率： $(\text{着床痕数} / \text{妊娠黄体数}) \times 100$ 、着床前胚損失率： $[(\text{妊娠黄体数} - \text{着床痕数}) / \text{妊娠黄体数}] \times 100$ 、着床後胚損失率： $[(\text{着床痕数} - \text{出産生児数}) / \text{着床痕数}] \times 100$ を算出した。

3) 分娩・哺育状態

妊娠動物は、全例を自然分娩させた。午後 3 時までには母動物が営巢し、児に授乳を開始した場合、分娩が完了したものとみなし、その日を分娩日とした。午後 3 時以降に分娩が完了した動物は、翌日を分娩日とした。交尾を認めた日から分娩完了までの日数を妊娠期間とした。出産児がすべて死亡した場合、生存児を出産しても難産などの分娩異常がみられた場合や、分娩完了が確認できない場合は異常出産とした。得られた結果から、出産率： $(\text{生児出産雌数}/\text{妊娠雌数}) \times 100$ 、分娩率： $(\text{出生児数}/\text{着床痕数}) \times 100$ を算出した。

4) 新生児の観察・検査

出生児は、出生日(生後 0 日と起算)に産児数、出産死亡児数、出產生児数、性別、出產生児外表について検査した。以降、生後 3 日まで一般状態、生児数、死亡児数を観察し、生後 4 日(屠殺日)に一般状態、生児数、性別、生児外表、死亡児数、死亡児外表について検査して、出生率： $(\text{出產生児数}/\text{着床痕数}) \times 100$ 、生児出生率： $(\text{出產生児数}/\text{出産児数}) \times 100$ 、0 日生児性比： $0 \text{ 日雄生児数}/0 \text{ 日生児数}$ 、外表異常率： $\text{外表異常を有する出產生児数}/\text{検査出產生児数} \times 100$ 、4 日生存率： $(\text{生後 4 日の生児数}/\text{出生時の出產生児数}) \times 100$ 、4 日生児性比： $4 \text{ 日雄生児数}/4 \text{ 日生児数}$ を算出した。また、出生日及び生後 4 日に腹単位で雌雄毎に体重を測定した。

6. 統計学的方法

親動物の体重(搬出時を除く)、摂餌量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、器官重量、平均性周期日数、交尾所要日数、妊娠期間、妊娠黄体数及び着床痕数、握力、自発運動量の成績、出生児の産児数、出產生児数、0 日生児性比、4 日生児性比及び体重については、Bartlett 法による検定を行い、5%有意水準で等分散が認められた場合、一元配置分散分析を行った。分散分析において有意差が認められた場合は、媒体対照群と各用量群の間において、Dunnett 法による検定を行った。等分散が認められない場合は Kruskal-Wallis の順位和検定法で全群の有意性を検定した後、Dunnett の多重比較検定法で媒体対照群との間の有意差検定を行った。

排糞回数(糞の数)、排尿回数(尿のプール数)は、Kruskal-Wallis の検定を行い、有意差が認められた場合は、Dunnett の多重比較検定法で媒体対照群との間の有意差検定を行った。

親動物の交尾率、授精率、受胎率、出産率、出生児の 0 日生児性比及び 4 日生児性比については、カイ二乗検定(ただし、いずれかの周辺度数が 10 以下なら Fisher の直接確率検定)で媒体対照群との間で有意差検定を行った。

親動物の着床率、着床前胚損失率、着床後胚損失率、分娩率、出生児の出生率、生児出産率、外表異常率、4 日生存率の各項目については、Kruskal-Wallis の順位和検定法で全群の有意性を検定した後、Dunnett の多重比較検定法で媒体対照群との間で有意差検定を行った。出生児の体重は、一腹を標本単位として雌雄毎に処理した。

結果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態

投与期間中、雄では、2 mg/kg 群の 1 例で流涎、20 mg/kg 群の 4 例で流涎、200 mg/kg 群の全例で流涎、4 例で自発運動低下がみられたが、いずれも投与直後から 5 分後までの発現であった。

雌では、交尾成立前に 200 mg/kg 群の 4 例で投与直後から 5 分後まで流涎がみられた。妊娠期間中に 20 mg/kg 群の 1 例で眼球の退色がみられたが、用量依存性のない変化であった。200 mg/kg 群では 10 例で投与直後から 5 分後まで流涎がみられた。分娩後には 20 mg/kg 群の 1 例で妊娠期間から引き続き眼球の退色がみられた。また、200 mg/kg 群の 6 例で投与直後から 5 分後まで流涎、1 例で軟便及び肛門周囲の汚れがみられた。このほか 200 mg/kg 回復群においても 1 例で投与直後から 5 分後まで流涎がみられた。

回復期間中は、雌雄ともに全例に一般状態の異常はみられなかった。

2) 詳細観察

投与期間中、雄では 20 mg/kg 群の 1 例で投与 5 週目のケージから取り出す際に連続した発声がみられたが、用量依存性のない変化であった。雌の全例に異常はみられなかった。

回復期間中、雄では 200 mg/kg 回復群で回復 2 週に排尿回数の有意な減少がみられた。雌の全例に異常はみられなかった。

3) 機能検査

投与期間中、雄の全例に異常はみられなかった。雌では、200 mg/kg 群の投与 6 週に 1 例で痛覚の過剰な反応がみられた。

回復期間中の検査は、投与期間中に被験物質投与の影響がみられなかったため、雌雄ともに実施しなかった。

4) 体重

投与期間中、回復期間中ともに、雌雄の被験物質投与群に有意差はみられなかった。

5) 摂餌量

投与期間中、回復期間中ともに、雌雄の被験物質投与群に有意差はみられなかった。

6) 血液学的検査(Table 1)

投与期間終了時、雄では 20 mg/kg 群で MCH の有意な増加がみられたが、用量依存性のない変化であった。200 mg/kg 群で APTT の有意な延長がみられた。雌の被験物質投与群に有意差

はみられなかった。

回復期間終了時、雄に有意差はみられなかった。雌では、200 mg/kg 回復群で赤血球数及び好塩基球比率の有意な減少がみられた。

7) 血液生化学的検査(Table 2)

投与期間終了時、回復期間終了時ともに、雌雄の被験物質投与群に有意差はみられなかった。

8) 器官重量(Table 3 及び 4)

投与期間終了時、雄では 200 mg/kg 群で腎臓の相対重量の有意な増加がみられた。雌の被験物質投与群に有意差はみられなかった。

回復期間終了時、雌雄ともに有意差はみられなかった。

9) 剖検

投与期間終了時、雄では、200 mg/kg 群の 1 例で腺胃の粘膜陥凹部、4 例で腎臓の表面点状模様明瞭化がみられた。このほか 2 mg/kg 群の 1 例で腺胃の粘膜隆起部、別の 1 例で肝臓の白色部がみられたが、用量依存性のない変化であった。雌では、200 mg/kg 群で前胃の粘膜陥凹部及び腺胃の粘膜黒色部が各 1 例、2 例で胸腺の小型化がみられた。このほか媒体対照群の 2 例で腺胃の粘膜陥凹部、別の 2 例で胸腺の小型化、20 mg/kg 群の 1 例で眼球の眼房内白色部がみられたが、用量依存性のない変化であった。

回復期間終了時、雄では、媒体対照回復群の 1 例で精巣上体の白色部がみられた。雌では、200 mg/kg 回復群の 1 例で膣の結節がみられた。

全腹児が死亡した 200 mg/kg 群の 1 例で肝臓及び腎臓の退色、胸腺の小型化がみられた。

不妊の 20 mg/kg 群の 1 例で脱毛がみられた。

10) 病理組織学的検査(Table 5)

投与期間終了時、雄では、20 mg/kg 群の 1 例で腎臓の好酸性小体増加、200 mg/kg 群の 1 例で限局性心筋炎、3 例で腎臓の好酸性小体増加、5 例で硝子滴増加、1 例で精巣上体の精子肉芽腫、2 例で前立腺の円形細胞浸潤がみられた。このほか媒体対照群の 1 例で空腸のパイエル板の鉍質沈着、3 例で精巣の成熟精子細胞の離出阻害及び精子細胞の基底側停滞、1 例で精巣上体の精子肉芽腫、1 例で前立腺の円形細胞浸潤及び甲状腺の鰓嚢遺残、2 mg/kg 群の 1 例で腺胃の扁平上皮嚢胞がみられたが、用量依存性のない変化であった。また、200 mg/kg 群の 1 例で腺胃の胃底腺部粘膜壊死がみられたが、自然発生病変として観察される変化で、同様の変化が雌の媒体対照群にもみられているため、偶発的变化と判断した。雌では、200 mg/kg 群の 1 例で前胃の扁平上皮のびまん性過形成及び潰瘍、肝臓の肝細胞空胞化、心臓の心筋の変性及び壊死及び腎臓の尿細管上皮の空胞化、2 例で胸腺の萎縮、1 例で甲状腺の鰓嚢遺残、1 例で副腎の皮質細胞の微細空胞化がみられた。このほか媒体対照群の 1 例で腺胃の胃底腺部粘膜壊死、1 例で腎

臓の好塩基性尿細管，1 例で腎臓の被膜下の孤在性嚢胞，1 例で腎臓の髓質の孤在性嚢胞及び胸腺の萎縮がみられた。

回復期間終了時，雄では，媒体対照回復群の 1 例で精巣上体の精子肉芽腫がみられたが，200 mg/kg 回復群に異常はみられなかった。雌では，200 mg/kg 回復群の 1 例で腔の扁平上皮嚢胞がみられた。

全腹児が死亡した 200 mg/kg 群の 1 例で肝臓の肝細胞空胞化，腎臓の尿細管上皮の変性及び壊死，胸腺の萎縮及び副腎の皮質細胞の微細空胞化がみられた。

不妊の 20 mg/kg 群の 1 例に異常はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 性周期検査

すべての被験物質投与群に性周期の異常はみられなかった。

2) 生殖能力検査(Table 6 及び Table 7)

媒体対照群，2，20 及び 200 mg/kg 群の妊娠動物数は，それぞれ 12，12，11 及び 12 匹であった。

交尾所要日数，交尾率，授精率，受胎率，妊娠期間，妊娠黄体数，着床痕数，着床率，着床前胚損失率，着床後胚損失率，出産率，分娩率において，被験物質投与群に有意差はみられなかった。

3) 分娩・哺育状態

媒体対照群の 1 例に哺育放棄がみられた。また，200 mg/kg 群の 1 例で乳頭未発達及び哺育放棄がみられ，分娩 2 日に全腹児が死亡した。

4) 新生児の観察・検査(Table 7)

(1) 新生児の出生日及び哺育期の検査

出産児数，出產生児数，出生率，生児出生率，0 日生児性比及び 4 日生児性比，外表異常率，4 日生存率において，被験物質投与群に有意差はみられなかった。

媒体対照群の哺育放棄がみられた 1 腹に体温低下，200 mg/kg 群の一般状態悪化及び哺育放棄がみられた 1 腹に体温低下がみられた後，全腹児が死亡した。

(2) 新生児の体重

雌雄ともに，出生日及び生後 4 日の体重において，被験物質投与群に有意差はみられなかった。

考察

1. 反復投与毒性

被験物質投与により胃に対する影響が示唆された。すなわち剖検では、雌の 200 mg/kg 群で前胃の粘膜陥凹部、腺胃の粘膜黒色部がみられた。病理組織学的検査では、雌の 200 mg/kg 群で前胃の扁平上皮のびまん性過形成及び潰瘍がみられた。本被験物質は、ウサギの皮膚に対して中等度の刺激性があり[1, 3]、マウスに 13 週間反復経口投与した実験においても胃炎がみられることが報告されている[4]。したがって本試験の 200 mg/kg 群でみられた前胃の扁平上皮の過形成及び潰瘍は、被験物質の刺激性による変化と判断した。

このほか雄の 2 mg/kg 以上の群及び雌の 200 mg/kg 群でみられた流涎は、先に実施した 14 日間の用量設定試験においてもみられたが、被験物質による粘膜刺激性が示唆されていることから神経系に対するものではなく、投与直後のみの一過性の発現のため、刺激性に起因する二次的影響と判断した。さらに用量設定試験においては、雄の 250 mg/kg 以上の群及び雌の 500 mg/kg 以上の群で自発運動低下及び呼吸数減少、雌雄の 1,000 mg/kg 群でラッセル音、紅涙、ひきずり歩行、雄の 1,000 mg/kg 群で横臥位、円背位、うずくまり、易刺激性、震戦、つま先歩行、雌の 1,000 mg/kg 群であえぎ呼吸、よろめき歩行などがみられ、神経系への影響が疑われた。しかし本試験では、雄の 200 mg/kg 群で自発運動低下がみられたのみで他の変化は観察されなかった。

14 日間の休薬期間の結果、胃の変化及び自発運動低下はすべて消失した。

機能検査においては、雌の 200 mg/kg 群で投与 6 週目に痛覚の過剰反応がみられたが、1 例のみの変化で、一般状態観察又は詳細観察において動物の観察や投与時の保定などの外部刺激に対して過剰な反応を示さなかったことから、偶発的变化と考えた。

血液学的検査においては、雄の 200 mg/kg 群で活性化部分トロンボプラスチン時間の延長がみられたが、片性のみの軽微な変動のため、偶発的变化と判断した。

器官重量においては、雄の 200 mg/kg 群で腎臓の相対重量の増加がみられ、雄の 20 mg/kg 以上の群で腎臓の好酸性小体増加、雄の 200 mg/kg 群で腎臓の硝子滴増加がみられた。しかし抗 Alpha2u-グロブリン抗体陽性物質の沈着が確認されたことから、雄ラット特有で、ヒトに対する毒性学的意義に乏しい変化と考えた。

病理組織学的検査においては、雄の 200 mg/kg 群で前立腺の円形細胞浸潤及び雌の 200 mg/kg 群で胸腺の萎縮がみられたが、同様の変化が媒体対照群にも観察されていることから、被験物質投与の影響ではないと判断した。また、雄の同群で心臓の限局性心筋炎、精巣上体の精子肉芽腫、雌で肝臓の肝細胞の空胞化、腎臓の尿細管上皮の空胞化、甲状腺の鰓嚢遺残、副腎の皮質細胞の微細空胞化がみられたが、いずれも発現例数が少なく、自然発生病変としても散見される変化のため、偶発的变化と考えた。また、雌でみられた心筋の変性及び壊死は、胃からの出血に起因する二次的变化と判断した。全腹児が死亡した 200 mg/kg 群の 1 例においては、肝臓の肝細胞空胞化、腎臓の尿細管上皮の変性及び壊死、胸腺の萎縮及び副腎の皮質細胞の微細

空胞化がみられた。この動物の摂餌量が妊娠 7～17 日までは 20 g 以上で推移しているが、妊娠 20 日は 18.9 g と低下しているため、分娩前から何らかの変化があった可能性があるが、肝臓、腎臓及び胸腺の変化における発現頻度や重篤度は、媒体対照群を含む他の雌動物と比して差がみられないこと、投与開始から剖検までの体重と妊娠 20 日から分娩翌日までの一般状態に異常がみられないことから、摂餌量の一時的な低下と全腹児死亡の関連は明らかではなく、被験物質投与の影響ではないと判断した。

2. 生殖発生毒性

200 mg/kg 群の 1 例で哺育放棄がみられ、児の体温低下がみられた後、全腹児が死亡した。しかし哺育放棄は、媒体対照群の 1 例にもみられる変化である。

4-ビニル-1-シクロヘキセンをマウスに 0, 100, 250 及び 500 mg/kg/day の用量で強制経口投与した連続交配実験においては、F₀及びF₁の受胎率、産児数、生存産児数及び産児生存率に異常がみられないとの報告がある[2, 5, 6]ことから、200 mg/kg群でみられた哺育放棄は、被験物質投与の影響ではなく、偶発的变化と判断した。

以上より、本試験条件下における 4-ビニル-1-シクロヘキセンの反復投与毒性に関する無毒性量(NOAEL)は、雄の 200 mg/kg 群で自発運動低下、雌の 200 mg/kg 群で前胃の粘膜陥凹部、腺胃の粘膜黒色部、前胃の扁平上皮のびまん性過形成及び潰瘍がみられたことから、雌雄ともに 20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する NOAEL は、親動物、児動物ともに異常がみられないことから、最高用量である 200 mg/kg/day と判断した。

一方、反復投与毒性に関する無影響量(NOEL)は、雄の 2 mg/kg 以上の群及び雌の 200 mg/kg 群で刺激性に起因する流涎がみられたことから、雄は 2 mg/kg/day 未満、雌は 20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する NOEL は、親動物、児動物ともに異常がみられないことから、200 mg/kg/day と判断した。

文献

- 1) ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienist (2001) Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices, 7th ed. Volumes I, II, III. Cincinnati, OH.
- 2) Grizzle, T.B., George, J.D., Fail, P.A., Seely, J.C. and Heindel J.J. (1994) Reproductive effects of 4-vinyl cyclohexene in Swiss mice assessed by continuous breeding protocol. Fundam. Appl. Toxicol., 22, 122-129.
- 3) Smyth, H.F., Jr., Carpenter, C.P., Weil, C.S. Pozzani, U.C., Striegel, J.A. and Nycum, J.S. (1969) Range finding toxicity data: List VII. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 30, 470-476.

- 4) U.S. NTP, National Toxicology Program (1986) NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of 4-vinylcyclohexene (CAS No. 100-40-3) in F344/N rats and B3C3F1 mice (gavage study). (Technical Report series No. 303), U.S. Research Triangle Park, NC.
- 5) U.S. NTP, National Toxicology Program (1989) Reproductive Toxicity of 4-Vinylcyclohexene (CAS No. 100-40-3) in CD-1 Swiss Mice. NTP Report # RACB90035, Report Date: May 6, 1991.
- 6) U.S. NTP, National Toxicology Program (1989) Reproductive toxicity testing by continuous breeding test protocol in Swiss (CD-1) mice. NTIS Accession No. PB 89152425/AS0. PB 89152425.

連絡先

一般財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所
〒877-0061 大分県日田市石井町3丁目822番地
Tel 0973-24-7211 Fax 0973-23-9800

Correspondence

Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
CERI Hita
3-822 Ishi-machi, Hita-shi, Oita 877-0061, Japan
Tel +81-973-24-7211 Fax +81-973-23-9800

本報告書は、平成20年度ハザード評価委員会(独立行政法人 製品評価技術基盤機構)で評価後、修正・加筆された。

Table 1 Hematological examination of rats treated orally with 4-vinyl-2-cyclohexene
in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Administration period				Recovery period	
	0	2	20	200	0	200
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	873 ± 14	861 ± 35	842 ± 24	869 ± 30	855 ± 39	854 ± 29
Hb (g/dL)	15.4 ± 0.2	15.5 ± 0.4	15.5 ± 0.6	15.8 ± 0.5	15.3 ± 0.4	15.2 ± 0.6
Ht (%)	46.2 ± 0.5	46.5 ± 0.8	46.6 ± 2.2	47.3 ± 1.0	45.6 ± 2.5	45.7 ± 1.7
MCV (fL)	53.0 ± 0.9	54.0 ± 1.7	55.4 ± 1.6	54.5 ± 1.3	53.3 ± 2.1	53.6 ± 1.8
MCH (pg)	17.7 ± 0.2	18.0 ± 0.6	18.4 * ± 0.3	18.2 ± 0.3	18.0 ± 0.7	17.8 ± 1.0
MCHC (g/dL)	33.4 ± 0.2	33.3 ± 0.2	33.2 ± 0.5	33.4 ± 0.4	33.7 ± 1.3	33.2 ± 1.2
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	102.5 ± 9.3	102.1 ± 6.4	94.2 ± 9.1	106.0 ± 8.9	102.4 ± 9.2	102.6 ± 8.0
Reticulo (%)	1.8 ± 0.5	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.4
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	105 ± 23	103 ± 3	106 ± 14	123 ± 26	124 ± 27	104 ± 30
Differentiation of leukocyte (%)						
Neutro	16.6 ± 5.0	19.1 ± 4.4	17.5 ± 4.9	14.7 ± 3.3	14.2 ± 5.6	13.6 ± 3.5
Lymph	79.2 ± 4.7	76.3 ± 4.4	78.8 ± 4.7	81.8 ± 3.3	81.4 ± 6.0	82.9 ± 2.9
Eosino	1.2 ± 0.5	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.5	0.9 ± 0.3
Baso	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.2
Mono	2.3 ± 0.3	2.6 ± 0.7	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.3	2.3 ± 0.5	1.8 ± 0.7
LUC	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3
PT (sec)	17.2 ± 1.8	16.2 ± 0.6	17.3 ± 1.5	17.1 ± 0.9	22.9 ± 4.8	23.3 ± 6.1
APTT (sec)	29.6 ± 2.7	29.8 ± 2.8	31.5 ± 3.1	34.5 * ± 2.5	35.5 ± 6.4	34.4 ± 7.4

Values are shown as mean \pm S.D.

*: Significantly different from 0 mg/kg/day at $p < 0.05$

Table 1 (Continued)

Dose (mg/kg/day)	Administration period				Recovery period	
	0	2	20	200	0	200
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	715 \pm 29	699 \pm 26	731 \pm 42	716 \pm 67	811 \pm 23	773 * \pm 22
Hb (g/dL)	13.5 \pm 0.7	13.8 \pm 0.2	13.9 \pm 0.6	13.8 \pm 1.3	15.0 \pm 0.4	14.5 \pm 0.5
Ht (%)	39.6 \pm 1.9	40.5 \pm 0.9	40.6 \pm 2.2	40.2 \pm 4.1	43.7 \pm 1.3	42.3 \pm 1.9
MCV (fL)	55.5 \pm 1.8	57.9 \pm 2.4	55.6 \pm 1.2	56.0 \pm 1.2	53.9 \pm 1.2	54.7 \pm 1.7
MCH (pg)	18.9 \pm 0.6	19.8 \pm 0.7	19.0 \pm 0.5	19.2 \pm 0.4	18.6 \pm 0.4	18.8 \pm 0.5
MCHC (g/dL)	34.1 \pm 0.3	34.2 \pm 0.6	34.1 \pm 0.5	34.3 \pm 0.3	34.4 \pm 0.6	34.3 \pm 0.5
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	123.8 \pm 14.4	126.4 \pm 12.1	123.0 \pm 10.3	117.1 \pm 16.7	120.4 \pm 16.1	114.5 \pm 11.6
Reticulo (%)	4.4 \pm 1.0	5.0 \pm 0.7	4.3 \pm 0.6	4.0 \pm 1.9	1.5 \pm 0.4	1.7 \pm 0.4
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	124 \pm 19	118 \pm 24	138 \pm 18	152 \pm 28	60 \pm 12	65 \pm 20
Differentiation of leukocyte (%)						
Neutro	42.0 \pm 6.2	39.3 \pm 8.0	40.8 \pm 2.5	35.2 \pm 7.0	17.6 \pm 3.9	18.9 \pm 1.7
Lymph	55.0 \pm 7.0	56.0 \pm 8.5	55.1 \pm 2.7	61.6 \pm 7.6	78.0 \pm 3.5	76.6 \pm 2.0
Eosino	0.7 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2	0.7 \pm 0.3	0.4 \pm 0.3	1.3 \pm 0.4	1.5 \pm 0.5
Baso	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.1 * \pm 0.0
Mono	1.7 \pm 0.9	3.2 \pm 1.4	2.7 \pm 0.9	2.1 \pm 1.5	2.4 \pm 0.9	2.3 \pm 0.7
LUC	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.4	0.5 \pm 0.4
PT (sec)	16.2 \pm 0.7	15.8 \pm 0.3	15.3 \pm 0.4	15.3 \pm 1.2	14.8 \pm 0.5	14.9 \pm 0.6
APTT (sec)	22.3 \pm 1.6	22.8 \pm 1.4	21.9 \pm 1.6	23.0 \pm 3.0	25.2 \pm 1.7	25.7 \pm 0.5

Values are shown as mean \pm S.D.

*: Significantly different from 0 mg/kg/day at $p < 0.05$

Table 2 Blood chemical examination of rats treated orally with 4-vinyl-2-cyclohexene
in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Administration period				Recovery period	
	0	2	20	200	0	200
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
AST (IU/L)	71 ± 6	66 ± 10	65 ± 3	73 ± 12	89 ± 15	81 ± 18
ALT (IU/L)	26 ± 2	24 ± 5	23 ± 3	23 ± 5	17 ± 3	16 ± 2
ALP (IU/L)	294 ± 89	287 ± 54	296 ± 42	314 ± 54	231 ± 47	226 ± 20
ChE (IU/L)	45 ± 11	49 ± 16	41 ± 5	39 ± 18	31 ± 6	34 ± 4
γ-GTP (IU/L)	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 2.0
T-Cho (mg/dL)	54 ± 7	58 ± 7	50 ± 7	51 ± 3	52 ± 9	50 ± 8
TG (mg/dL)	70 ± 45	58 ± 31	79 ± 33	48 ± 24	78 ± 27	54 ± 9
Glucose (mg/dL)	151 ± 10	176 ± 33	185 ± 16	160 ± 24	148 ± 16	153 ± 24
T-protein (g/dL)	5.7 ± 0.1	5.9 ± 0.1	5.7 ± 0.2	5.9 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.1
Albumin (g/dL)	2.8 ± 0.0	2.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.2
A/G ratio	0.95 ± 0.03	0.94 ± 0.05	0.99 ± 0.05	1.03 ± 0.11	0.83 ± 0.10	0.84 ± 0.10
BUN (mg/dL)	13.6 ± 2.3	14.4 ± 1.3	14.0 ± 1.6	11.2 ± 1.5	16.5 ± 2.6	16.5 ± 2.8
Creatinine (mg/dL)	0.27 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.26 ± 0.04
T-Bil (mg/dL)	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02
Ca (mg/dL)	9.8 ± 0.4	10.0 ± 0.2	9.8 ± 0.1	9.6 ± 0.3	9.6 ± 0.4	9.6 ± 0.4
IP (mg/dL)	6.3 ± 0.2	6.5 ± 0.2	6.8 ± 0.5	6.2 ± 0.4	7.3 ± 0.4	7.5 ± 0.5
Na (mEq/L)	145 ± 1	145 ± 2	145 ± 1	144 ± 1	145 ± 1	145 ± 1
K (mEq/L)	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.2	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.2
Cl (mEq/L)	108.5 ± 1.1	108.2 ± 1.8	107.2 ± 1.1	106.4 ± 1.6	107.6 ± 2.6	108.2 ± 2.1

Values are shown as mean ± S.D.

Table 2 (Continued)

Dose (mg/kg/day)	Administration period				Recovery period	
	0	2	20	200	0	200
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
AST (IU/L)	87 ± 26	66 ± 18	63 ± 7	106 ± 45	94 ± 22	90 ± 27
ALT (IU/L)	33 ± 11	24 ± 8	26 ± 5	49 ± 23	38 ± 7	37 ± 5
ALP (IU/L)	167 ± 31	136 ± 58	147 ± 27	146 ± 47	108 ± 27	107 ± 17
ChE (IU/L)	165 ± 28	239 ± 58	197 ± 52	216 ± 109	442 ± 91	441 ± 95
γ-GTP (IU/L)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.3
T-Cho (mg/dL)	70 ± 14	71 ± 12	64 ± 7	80 ± 31	71 ± 16	65 ± 12
TG (mg/dL)	54 ± 6	83 ± 33	112 ± 72	49 ± 28	31 ± 23	18 ± 10
Glucose (mg/dL)	141 ± 6	161 ± 21	158 ± 18	142 ± 18	145 ± 32	132 ± 28
T-protein (g/dL)	5.6 ± 0.3	6.3 ± 0.6	5.9 ± 0.4	6.0 ± 1.3	6.1 ± 0.4	6.2 ± 0.3
Albumin (g/dL)	2.8 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.9 ± 0.5	3.0 ± 0.4	3.1 ± 0.3
A/G ratio	1.00 ± 0.05	0.97 ± 0.03	1.06 ± 0.08	0.97 ± 0.10	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.10
BUN (mg/dL)	15.2 ± 1.9	16.6 ± 2.0	17.0 ± 1.6	13.0 ± 2.8	22.6 ± 2.7	21.3 ± 1.1
Creatinine (mg/dL)	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.31 ± 0.06	0.40 ± 0.08	0.39 ± 0.05
T-Bil (mg/dL)	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02
Ca (mg/dL)	9.3 ± 0.6	10.3 ± 1.1	9.7 ± 0.5	10.0 ± 1.4	10.1 ± 7.0	10.2 ± 0.6
IP (mg/dL)	9.8 ± 0.7	10.1 ± 1.3	10.6 ± 1.5	10.6 ± 1.5	6.5 ± 0.4	6.4 ± 0.4
Na (mEq/L)	143 ± 1	144 ± 1	143 ± 1	143 ± 1	144 ± 2	144 ± 2
K (mEq/L)	4.4 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.4	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.2
Cl (mEq/L)	107.3 ± 1.4	108.1 ± 0.8	108.8 ± 1.3	106.6 ± 0.7	106.3 ± 0.9	107.3 ± 1.4

Values are shown as mean ± S.D.

Table 3 Absolute organ weights of rats treated orally with 4-vinyl -1-cyclohexane
in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Administration period				Recovery period	
	0	2	20	200	0	200
Male						
No. of animals	7	12	12	7	5	5
Liver (g)	13.09 ± 2.59	12.39 ± 1.30	12.94 ± 1.10	12.36 ± 0.96	11.92 ± 1.34	12.07 ± 0.62
Heart (g)	1.40 ± 0.16	1.41 ± 0.15	1.40 ± 0.14	1.44 ± 0.16	1.44 ± 0.07	1.52 ± 0.21
Kidney (g)	2.85 ± 0.28	2.80 ± 0.21	2.94 ± 0.20	3.10 ± 0.30	3.02 ± 0.27	3.17 ± 0.32
Testis (g)	3.31 ± 0.30	3.42 ± 0.22	3.39 ± 0.25	3.37 ± 0.40	3.37 ± 0.08	3.16 ± 0.35
Epididymis (g)	1.25 ± 0.08	1.29 ± 0.07	1.29 ± 0.06	1.26 ± 0.10	1.30 ± 0.07	1.19 ± 0.11
Brain (g)	2.10 ± 0.10	2.10 ± 0.08	2.11 ± 0.10	2.13 ± 0.07	2.13 ± 0.10	2.16 ± 0.03
Spleen (g)	0.68 ± 0.14	0.68 ± 0.09	0.67 ± 0.07	0.70 ± 0.08	0.70 ± 0.08	0.71 ± 0.12
Thymus (mg)	291.4 ± 60.0	320.1 ± 66.9	336.9 ± 81.3	253.6 ± 53.2	288.4 ± 43.3	304.9 ± 84.3
Adrenal (mg)	62.5 ± 9.7	60.9 ± 8.1	62.5 ± 8.6	64.3 ± 11.1	53.8 ± 4.0	55.5 ± 6.2
Body weight (g)	470.7 ± 55.4	459.2 ± 25.5	465.5 ± 28.2	443.2 ± 22.0	471.6 ± 39.2	468.2 ± 31.5
Female						
No. of animals	12	12	11	11	5	5
Liver (g)	9.95 ± 0.75	10.04 ± 0.70	9.76 ± 0.63	9.62 ± 1.19	6.61 ± 0.97	7.11 ± 0.23
Heart (g)	0.96 ± 0.09	0.93 ± 0.06	0.96 ± 0.09	0.89 ± 0.12	0.96 ± 0.05	0.99 ± 0.07
Kidney (g)	1.87 ± 0.17	1.82 ± 0.13	1.85 ± 0.19	1.81 ± 0.16	1.72 ± 0.10	1.87 ± 0.19
Brain (g)	1.94 ± 0.07	2.00 ± 0.05	1.99 ± 0.08	1.97 ± 0.08	2.01 ± 0.05	1.94 ± 0.09
Spleen (g)	0.59 ± 0.07	0.58 ± 0.11	0.53 ± 0.07	0.54 ± 0.09	0.45 ± 0.05	0.51 ± 0.08
Thymus (mg)	194.8 ± 68.9	211.7 ± 42.6	203.7 ± 59.5	194.0 ± 76.6	288.1 ± 76.6	303.0 ± 46.2
Adrenal (mg)	72.2 ± 9.9	75.8 ± 7.5	74.2 ± 9.0	75.4 ± 12.5	70.0 ± 5.8	71.7 ± 9.5
Body weight (g)	297.6 ± 23.3	304.9 ± 17.3	292.8 ± 13.1	279.3 ± 29.1	267.9 ± 27.4	269.4 ± 6.6

Value are shown as mean ± S.D.

Table 4 Relative organ weights of rats treated orally with 4-vinyl -1-cyclohexane
in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

Dose (mg/kg/day)	Administration period				Recovery period	
	0	2	20	200	0	200
Male						
No. of animals	7	12	12	7	5	5
Liver (g/100g)	2.76 ± 0.26	2.70 ± 0.22	2.78 ± 0.16	2.79 ± 0.14	2.52 ± 0.13	2.58 ± 0.08
Heart (g/100g)	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.03
Kidney (g/100g)	0.61 ± 0.07	0.61 ± 0.04	0.63 ± 0.03	0.70 ** ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.68 ± 0.07
Testis (g/100g)	0.72 ± 0.13	0.75 ± 0.05	0.73 ± 0.06	0.76 ± 0.08	0.72 ± 0.06	0.68 ± 0.08
Epididymis (g/100g)	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.26 ± 0.03
Brain (g/100g)	0.45 ± 0.05	0.46 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.48 ± 0.03	0.45 ± 0.06	0.46 ± 0.03
Spleen (g/100g)	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02
Thymus (mg/100g)	61.5 ± 6.8	69.5 ± 12.6	72.8 ± 18.9	57.0 ± 10.5	61.1 ± 7.8	64.6 ± 14.6
Adrenal (mg/100g)	13.4 ± 2.0	13.2 ± 1.4	13.4 ± 1.3	14.5 ± 2.5	11.5 ± 1.5	11.9 ± 1.7
Body weight (g)	470.7 ± 55.4	459.2 ± 25.5	465.5 ± 28.2	443.2 ± 22.0	471.6 ± 39.2	468.2 ± 31.5
Female						
No. of animals	12	12	11	11	5	5
Liver (g/100g)	3.35 ± 0.18	3.29 ± 0.11	3.33 ± 0.19	3.44 ± 0.21	2.46 ± 0.15	2.64 ± 0.12
Heart (g/100g)	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.03
Kidney (g/100g)	0.63 ± 0.05	0.60 ± 0.04	0.63 ± 0.06	0.65 ± 0.05	0.64 ± 0.04	0.69 ± 0.07
Brain (g/100g)	0.65 ± 0.05	0.66 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.71 ± 0.08	0.76 ± 0.07	0.72 ± 0.03
Spleen (g/100g)	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.03
Thymus (mg/100g)	64.9 ± 21.3	69.2 ± 11.9	69.6 ± 20.3	68.5 ± 24.7	106.5 ± 112.5	112.5 ± 16.9
Adrenal (mg/100g)	24.4 ± 3.9	24.9 ± 2.4	25.3 ± 2.6	27.1 ± 4.1	26.3 ± 2.9	26.6 ± 3.2
Body weight (g)	297.6 ± 23.3	304.9 ± 17.3	292.8 ± 13.1	279.3 ± 29.1	267.9 ± 27.4	269.4 ± 6.6

Value are shown as mean ± S.D.

**: Significantly different from 0 mg/kg/day at $p < 0.01$

Table 5 Histopathological findings of rats treated orally with 4-vinyl-2-cyclohexene
in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)		Male						Female								
		0	0	2	20	200	200	0	0	2	20	200	200			
		R					R					R				
		ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ia-nd	ta	ia-pd	ta	
	Grade	7 ^{a)}	5	12	12	7	5	12	5	12	11	1	11	1	5	
Trachea																
	No abnormalities detected	5/5 ^{b)}	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—	
Lung																
	No abnormalities detected	5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—	
Forestomach																
	No abnormalities detected	5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	5/5	5/5	5/5	—	4/5	1/1	5/5	
	Diffuse hyperplasia of squamous epithelium	+	0/5	—	—	0/5	—	0/5	0/5	0/5	0/5	—	1/5	0/1	0/5	
	Ulcer	+	0/5	—	—	0/5	—	0/5	0/5	0/5	0/5	—	1/5	0/1	0/5	
Glandular stomach																
	No abnormalities detected	5/5	5/5	4/5	5/5	4/5	5/5	4/5	—	—	—	—	5/5	1/1	—	
	Necrosis of fundic mucosa	+	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	1/5	—	—	—	—	0/5	0/1	—	
	Squamous epithelial cyst	+	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	—	—	—	—	0/5	0/1	—	
Duodenum																
	No abnormalities detected	5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—	
Jejunum																
	No abnormalities detected	4/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—	
	Mineralization in Peyer’s patches	+	1/5	—	—	0/5	—	0/5	—	—	—	—	0/5	—	—	
Ileum																
	No abnormalities detected	5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—	
Cecum																
	No abnormalities detected	5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—	

R, recovery

ta, terminal autopsy; ia-nd, female animal did not deliver her pups; ia-pd, dam all her pups were dead

a) Number of animals autopsied

b) Number of animals affected / Number of animals examined

—, Not examined

+, slight

Table 5 (Continued)

Dose (mg/kg/day)	Grade	Male						Female							
		0	0	2	20	200	200	0	0	2	20	200	200		
		R						R							
		ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ia-nd	ta	ia-pd	ta	
		7 ^{a)}	5	12	12	7	5	12	5	12	11	1	11	1	5
Colon															
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Rectum															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Liver															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	5/5	5/5	5/5	—	4/5	0/1	5/5
Vacuolization of hepatocytes	+	0/5	—	—	—	0/5	—	0/5	0/5	0/5	0/5	—	1/5	1/1	0/5
Heart															
No abnormalities detected		5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	—	4/5	1/1	5/5
Focal myocarditis	+	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	0/5	0/1	0/5
Myocardial degeneration and necrosis	+	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	1/5	0/1	0/5
Kidney															
No abnormalities detected		5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	5/5	3/5	5/5	5/5	5/5	—	4/5	0/1	5/5
Basophilic tubules	+	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	—	0/5	0/1	0/5
Degeneration and necrosis of tubular epithelium	+	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	0/5	1/1	0/5
Increased eosinophilic bodies	+	0/5	0/5	0/5	1/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	0/5	0/1	0/5
Increased hyaline droplets	+	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	0/5	0/1	0/5
	++	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	0/5	0/1	0/5
Solitary cyst in medulla	+	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	—	0/5	0/1	0/5
Subcapsular solitary cyst	+	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	—	0/5	0/1	0/5
Vacuolization of tubular epithelium	+	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	1/5	0/1	0/5

R, recovery

ta, terminal autopsy; ia-nd, female animal did not deliver her pups; ia-pd, dam all her pups were dead

a) Number of animals autopsied

b) Number of animals affected / Number of animals examined

—, Not examined

+, slight; ++, moderate

Table 5 (Continued)

Dose (mg/kg/day)	Grade	Male						Female							
		0	0	2	20	200	200	0	0	2	20	200	200		
		R				R		R						R	
		ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ia-nd	ta	ia-pd	ta	
		7 ^{a)}	5	12	12	7	5	12	5	12	11	1	11	1	5
Urinary bladder															
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Testis															
No abnormalities detected		2/5	—	—	—	5/5	—								
Inhibited spermiation and deep retention of spermatids	+	2/5	—	—	—	0/5	—								
	++	1/5	—	—	—	0/5	—								
Epididymis															
No abnormalities detected		4/5	0/1	—	—	4/5	—								
Spermatic granuloma	+	1/5	0/1	—	—	0/5	—								
	++	0/5	1/1	—	—	1/5	—								
Prostate															
No abnormalities detected		4/5	—	—	—	3/5	—								
Round cell infiltration	+	1/5	—	—	—	1/5	—								
	++	0/5	—	—	—	1/5	—								
Seminal vesicle															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—								
Ovary															
No abnormalities detected								5/5	—	—	—	1/1	5/5	—	—
Uterus															
No abnormalities detected								5/5	—	—	—	1/1	5/5	—	—
Vagina															
No abnormalities detected								5/5	—	—	—	1/1	5/5	—	0/1
Squamous epithelial cyst	+							0/5	—	—	—	0/1	0/5	—	1/1

R, recovery

ta, terminal autopsy; ia-nd, female animal did not deliver her pups; ia-pd, dam all her pups were dead

a) Number of animals autopsied

b) Number of animals affected / Number of animals examined

—, Not examined

+, slight; ++, moderate

Table 5 (Continued)

Dose (mg/kg/day)	Grade	Male						Female							
		0	0	2	20	200	200	0	0	2	20	200	200		
		R		R		R		R		R		R		R	
		ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ta	ia-nd	ta	ia-pd	ta	
		7 ^{a)}	5	12	12	7	5	12	5	12	11	1	11	1	5
Cerebrum															
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Cerebellum															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Pons															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Spinal cord															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Sciatic nerve															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Bone marrow															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Axillar lymph node															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Mesenteric lymph node															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Spleen															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Thymus															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	4/5	5/5	5/5	5/5	—	3/5	0/1	5/5
Atrophy	+	0/5	—	—	—	0/5	—	1/5	0/5	0/5	0/5	—	1/5	0/1	0/5
	++	0/5	—	—	—	0/5	—	0/5	0/5	0/5	0/5	—	1/5	1/1	0/5
Pituitary gland															
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Thyroid															
No abnormalities detected		4/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	4/5	—	—
Ultimobranchial rest	+	1/5	—	—	—	0/5	—	0/5	—	—	—	—	1/5	—	—
Parathyroid															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	—	—	—	—	5/5	—	—
Adrenal															
No abnormalities detected		5/5	—	—	—	5/5	—	5/5	5/5	5/5	5/5	—	4/5	0/1	5/5
Fine vacuolization of cortical cells	+	0/5	—	—	—	0/5	—	0/5	0/5	0/5	0/5	—	1/5	1/1	0/5

R, recovery

ta, terminal autopsy; ia-nd, female animal did not deliver her pups; ia-pd, dam all her pups were dead

a) Number of animals autopsied

b) Number of animals affected / Number of animals examined

—, Not examined

+, slight; ++, moderate

Table 6 Reproductive parameters in parental rats treated orally with 4-vinyl-1-cyclohexene in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)			
	0	2	20	200
Number of mated pairs	12	12	12	12
Number of copulated pairs	12	12	12	12
Number of pregnant females	12	12	11	12
Copulation index ^{a)} (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Fertilization index ^{b)} (%)	100.0	100.0	91.7	100.0
Conception index ^{c)} (%)	100.0	100.0	91.7	100.0
Pairing days until copulation (Mean \pm S.D.)	2.6 \pm 1.7	1.5 \pm 0.7	1.6 \pm 0.8	2.3 \pm 1.0

a) (Number of copulated pairs /Number of mated pairs) \times 100

b) (Number of impregnated males /Number of males in copulated pairs) \times 100

c) (Number of pregnant females /Number of females in copulated pairs) \times 100

Table 7 Postnatal course of rat litters whose parents treated orally with 4-vinyl-1-cyclohexene in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)			
	0	2	20	200
Number of pregnant	12	12	11	12
Gestation length (Mean \pm S.D., day)	21.9 \pm 0.7	22.0 \pm 0.0	21.9 \pm 0.3	22.0 \pm 0.0
Number of corpora lutea (Mean \pm S.D.)	15.4 \pm 1.7	14.5 \pm 1.8	15.2 \pm 1.1	15.3 \pm 1.5
Number of implantation sites (Mean \pm S.D.)	15.1 \pm 1.2	13.9 \pm 1.8	14.6 \pm 0.7	14.7 \pm 1.8
Implantation index ^{a)} (%)	98.1	96.2	96.6	96.2
Preimplantation loss ^{b)} (%)	1.9	3.9	3.4	3.8
Postimplantation loss ^{c)} (%)	9.1	11.7	7.6	8.0
Gestation index ^{d)} (%)	100.0 (12/12)	100.0 (12/12)	100.0 (11/11)	100.0 (12/12)
Delivery index ^{e)} (%)	94.2	89.4	93.7	93.2
Number of dams with live newborns				
on postpartum day 0	12	12	11	12
on postpartum day 4	12	12	11	11
Postnatal day 0				
Number of pups born (Mean \pm S.D.)	14.2 \pm 1.4	12.5 \pm 2.0	13.7 \pm 1.5	13.8 \pm 2.5
Number of live pups (Mean \pm S.D.)	13.7 \pm 1.7	12.3 \pm 2.0	13.5 \pm 1.6	13.6 \pm 2.5
Number of live males (Mean \pm S.D.)	7.0 \pm 2.1	6.9 \pm 2.2	7.1 \pm 2.2	6.3 \pm 2.9
Number of live females (Mean \pm S.D.)	6.7 \pm 2.3	5.4 \pm 1.4	6.5 \pm 2.0	7.3 \pm 1.5
Birth index ^{f)} (%)	90.9	88.3	92.4	92.1
Live birth index ^{g)} (%)	96.5	98.8	98.7	98.8
Sex ratio ^{h)}	84/164	83/148	78/149	76/163
(Mean \pm SD)	0.51 \pm 0.15	0.55 \pm 0.14	0.52 \pm 0.14	0.45 \pm 0.16
External anomaly index ⁱ⁾ (%)	0.0 (0/164)	0.0 (0/148)	0.0 (0/149)	0.0 (0/163)
Pups weight (Mean \pm S.D., g)				
Male	6.46 \pm 0.58	6.87 \pm 0.48	6.42 \pm 0.28	6.33 \pm 0.79
Female	6.18 \pm 0.56	6.47 \pm 0.45	6.10 \pm 0.22	5.78 \pm 0.61
Postnatal day 4				
Number of live pups (Mean \pm S.D.)	13.4 \pm 1.8	12.3 \pm 2.0	13.5 \pm 1.6	11.7 \pm 4.2
Number of live males (Mean \pm S.D.)	6.9 \pm 2.1	6.9 \pm 2.2	7.1 \pm 2.2	5.3 \pm 2.8
Number of live females (Mean \pm S.D.)	6.5 \pm 2.5	5.4 \pm 1.4	6.5 \pm 2.0	6.4 \pm 2.5
Viability index ^{j)} (%)	98.1	100.0	100.0	87.7
Sex ratio ^{k)}	83/161	83/148	78/149	63/140
(Mean \pm SD)	0.52 \pm 0.16	0.55 \pm 0.14	0.52 \pm 0.14	0.43 \pm 0.15
Pups weight (Mean \pm S.D., g)				
Male	10.25 \pm 1.82	11.08 \pm 1.21	10.19 \pm 0.95	9.49 \pm 2.15
Female	9.78 \pm 1.66	10.63 \pm 1.08	9.80 \pm 0.96	8.85 \pm 1.80

a) (Number of implantation sites /Number of corpora lutea) \times 100

b) [(Number of corpora lutea - Number of implantation sites) /Number of corpora lutea] \times 100

c) [(Number of implantation sites - Number of live pups on postnatal day 0) /Number of implantation sites] \times 100

d) (Number of pregnant females with live pups /Number of pregnant females) \times 100

e) (Number of pups born /Number of implantation sites) \times 100

f) (Number of live pups on postnatal day 0 /Number of implantation sites) \times 100

g) (Number of live pups on postnatal day 0 /Number of pups born) \times 100

h) Number of live males on postnatal day 0 / Number of live pups on postnatal day 0

i) (Number of live pups with external anomalies/Number of live pups examined) \times 100

j) (Number of live pups on postnatal day 4 /Number of live pups on postnatal day 0) \times 100

k) Number of live males on postnatal day 4 / Number of live pups on postnatal day 4