

Table 9 - 2 Hematology - Group mean values in female mice
After 28 weeks of treatment

Dose (ppm)	No. of animals examined	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	Differential leukocyte count ($10^3/\mu\text{L}$)						
			L	N	M	E	B	LUC	
0	10	Mean	1.57	1.60	0.06	0.03	0.00	0.02	
		S.D.	1.06	0.91	0.03	0.01	0.01	0.02	
90	10	Mean	1.58	1.07	0.05	0.03	0.00	0.02	
		S.D.	0.50	0.76	0.02	0.01	0.01	0.01	
UVB+0	10	Mean	12.88 *	8.47 *	0.06	0.14	0.03 *	0.27	
		S.D.	10.54	9.06	0.03	0.18	0.03	0.36	
UVB+1	10	Mean	4.50	19.38	0.10	0.24	0.10	0.40	
		S.D.	39.93	36.79	0.05	0.27	0.23	0.57	
UVB+10	10	Mean	18.30	13.36	0.08	0.24	0.04	0.39	
		S.D.	11.71	9.73	0.03	0.19	0.03	0.28	
UVB+90	10	Mean	44.31	37.24	0.14	0.38	0.27	0.63	
		S.D.	59.10 (9)	54.57 (9)	0.12 (9)	0.49 (9)	0.48 (9)	0.81 (9)	

S.D. : Standard deviation.

() : Available number of animals for the parameter.

Significantly different from 0 ppm group (Student's t test or Aspin-Welch test): *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Key to Table 10
Standard key to blood biochemistry data

Blood Biochemistry:

ALP	Alkaline phosphatase
AST	Aspartate aminotransferase
ALT	Alanine aminotransferase
GGTP	γ -Glutamyl transpeptidase
Creat	Creatinine
BUN	Blood urea nitrogen
TP	Total protein
Alb	Albumin
Glob	Globulin
A/G ratio	Albumin/globulin ratio
Gluc	Glucose
T.Chol	Total cholesterol
TG	Triglyceride
T.Bil	Total bilirubin
Ca	Calcium
P	Inorganic phosphorus

Table 10 - 1
Blood biochemistry - Group mean values in female mice
After 28 weeks of treatment

Dose (ppm)	No. of animals examined	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGTP (U/L)	Creat (mg/dL)	BUN (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	Glob (g/dL)	A/G ratio	Gluc (mg/dL)
0	10 Mean	157	68	35	0	0.17	14.3	5.31	3.10	2.21	1.43	201
	S.D.	49	24	28	0	0.05	1.2	0.41	0.14	0.32	0.19	29
90	10 Mean	154	53	20	0	0.17	16.2	5.34	3.06	2.28	1.35	209
	S.D.	37	8	4	0	0.05	5.0	0.43	0.17	0.29	0.12	16
UVB+0	10 Mean	100 **	86	38	1	0.12 *	17.7 **	5.64	3.23	2.40	1.36	160 *
	S.D.	26	43	23	3	0.02	2.0	0.35	0.15	0.29	0.17	40
UVB+1	10 Mean	114	90	40	1	0.13	16.5	5.47	3.10	2.37	1.34	155
	S.D.	38	29	17	2	0.05	2.2	0.58	0.16	0.45	0.18	29
UVB+10	10 Mean	98	79	35	1	0.10	16.8	5.76	3.32	2.44	1.38	143
	S.D.	35	19	11	2	0.04	3.3	0.53	0.19	0.35	0.15	32
UVB+90	10 Mean	135	112	36	18	0.12	20.2	5.58	3.14	2.44	1.33	147
	S.D.	48 (9)	117 (9)	25 (9)	52 (9)	0.03 (9)	3.2 (9)	0.56 (9)	0.15 (9)	0.51 (9)	0.22 (9)	52 (9)

S.D. : Standard deviation.

() : Available number of animals for the parameter.

Significantly different from 0 ppm group (Student's t test or Aspin-Welch test): *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 10 - 2 Blood biochemistry - Group mean values in female mice
After 28 weeks of treatment

Dose (ppm)	No. of animals examined	T.Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	T.Bil (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)
0	10 Mean	97	52	0.07	9.2	8.9
	S.D.	45	19	0.02	0.3	1.3
90	10 Mean	84	63	0.07	9.1	8.1
	S.D.	8	21	0.01	0.3	1.0
UVB+0	10 Mean	73	49	0.06	9.9 **	8.0
	S.D.	13	19	0.01	0.6	1.0
UVB+1	10 Mean	66	39	0.05	9.8	7.6
	S.D.	9	12	0.03	0.9	0.8
UVB+10	10 Mean	73	48	0.05	10.6	7.8
	S.D.	12	13	0.02	1.3	1.2
UVB+90	10 Mean	66	71	0.07	10.1	8.1
	S.D.	14 (9)	37 (9)	0.04 (9)	0.5 (9)	1.1 (9)

S.D. : Standard deviation.

() : Available number of animals for the parameter.

Significantly different from 0 ppm group (Student's t test or Aspin-Welch test): *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 11 - 1 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female mice
Terminal kill after 28 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (ppm)	0	90	UVB+0	UVB+1	UVB+10	UVB+90
	No. of animals examined	23	22	23	23	23	23
Systemic/external appearance :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Amputation of tail		1	0	0	0	0	0
Skin(#):	[N=]	23	22	23	23	23	23
Subcutaneous mass(es)		0	0	0	4	1	1
Erosion/ulcer		0	0	15 **	9	10	6 ++
Spleen :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Pale in color		0	0	0	1	0	2
Spot(s)		0	0	0	0	1	0
Enlargement		1	1	19 **	19	21	22
Lymph node :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Enlargement		1	0	22 **	23	23	23
Muscle :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Mass(es)		0	0	0	0	0	1
Lung :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Mass(es)		0	1	0	0	0	0
Liver :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Spot(s)		0	1	0	2	2	3
Sclerosis		0	0	4	3	4	5
Atrophy		0	0	0	1	1	2
Enlargement		0	0	0	0	0	2
Adhesion between lobes		0	0	0	0	0	1
Adhesion to stomach		0	0	1	0	0	0
Adhesion to small intestine		0	0	0	0	0	1
Adhesion to spleen		0	0	0	0	0	1
Mass(es)		0	0	0	0	0	1
Kidney :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Spot(s)		0	0	0	0	1	0
Ovary :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Cyst(s)		1	2	0	1	0	0
Uterus :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Thickened wall		1	0	0	0	0	1
Eye :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Opacity		3	3	7	6	12	9
Enlargement		0	1	0	0	0	0
Exophthalmos		0	0	0	0	1	0
Auricle :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Mass(es)		0	1	0	0	0	0
Tail :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Bending		0	1	0	1	0	1
Thoracic cavity :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Hydrothorax		0	0	0	0	0	1
Abdominal cavity :	[N=]	23	22	23	23	23	23
Mass(es)		0	0	1	0	0	0

[N=]: Number of animals examined at the site.

#: Masses that observed on the external surface of skin were not contained.

Significantly different from 0 ppm group (Fisher's exact probability test): *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Significantly different from UVB+0 ppm group (Fisher's exact probability test): +, $p \leq 0.05$; ++, $p \leq 0.01$.

Table 11 - 2 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female mice
Killed *in extremis* or found dead

Site & Lesion	Dose (ppm)	0	90	UVB+0	UVB+1	UVB+10	UVB+90
	No. of animals examined	0	1	0	0	0	0
Systemic/external appearance :	[N=]	0	1	0	0	0	0
Emaciation		0	1	0	0	0	0
Thymus :	[N=]	0	1	0	0	0	0
Enlargement		0	1	0	0	0	0
Lymph node :	[N=]	0	1	0	0	0	0
Enlargement		0	1	0	0	0	0

[N=]: Number of animals examined at the site.

Table 11 - 3 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female mice
All animals examined

Site & Lesion	Dose (ppm)	0	90	UVB+0	UVB+1	UVB+10	UVB+90
	No. of animals examined	23	23	23	23	23	23
Systemic/external appearance :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Emaciation		0	1	0	0	0	0
Amputation of tail		1	0	0	0	0	0
Skin(#):	[N=]	23	23	23	23	23	23
Subcutaneous mass(es)		0	0	0	4	1	1
Erosion/ulcer		0	0	15 **	9	10	6 ++
Spleen :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Pale in color		0	0	0	1	0	2
Spot(s)		0	0	0	0	1	0
Enlargement		1	1	19 **	19	21	22
Thymus :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Enlargement		0	1	0	0	0	0
Lymph node :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Enlargement		1	1	22 **	23	23	23
Muscle :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Mass(es)		0	0	0	0	0	1
Lung :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Mass(es)		0	1	0	0	0	0
Liver :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Spot(s)		0	1	0	2	2	3
Sclerosis		0	0	4	3	4	5
Atrophy		0	0	0	1	1	2
Enlargement		0	0	0	0	0	2
Adhesion between lobes		0	0	0	0	0	1
Adhesion to stomach		0	0	1	0	0	0
Adhesion to small intestine		0	0	0	0	0	1
Adhesion to spleen		0	0	0	0	0	1
Mass(es)		0	0	0	0	0	1
Kidney :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Spot(s)		0	0	0	0	1	0
Ovary :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Cyst(s)		1	2	0	1	0	0
Uterus :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Thickened wall		1	0	0	0	0	1
Eye :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Opacity		3	3	7	6	12	9
Enlargement		0	1	0	0	0	0
Exophthalmos		0	0	0	0	1	0
Auricle :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Mass(es)		0	1	0	0	0	0
Tail :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Bending		0	1	0	1	0	1
Thoracic cavity :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Hydrothorax		0	0	0	0	0	1
Abdominal cavity :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Mass(es)		0	0	1	0	0	0

[N=]: Number of animals examined at the site.

#: Masses that observed on the external surface of skin were not contained.

Significantly different from 0 ppm group (Fisher's exact probability test): *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Significantly different from UVB+0 ppm group (Fisher's exact probability test): +, $p \leq 0.05$; ++, $p \leq 0.01$.

Table 12 - 1 Organ weight - Group mean values in female mice
Absolute weight at terminal kill after 28 weeks of treatment

Dose (ppm)			Body weight						
			(g)	Lung (mg)	Liver (g)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Gut (g)	
0	Mean		38.5	201	2.26	519	239	4.01	
	S.D.		6.7	22	0.47	73	65	0.58	
	N		10	9	10	10	10	10	
90	Mean		38.7	200	2.19	517	221	4.09	
	S.D.		5.3	14	0.24	55	68	0.51	
	N		10	10	10	10	10	10	
UVB+0	Mean		35.5	220	2.43	573	600 **	3.70	
	S.D.		3.7	30	0.40	75	257	0.45	
	N		10	10	10	10	10	10	
UVB+1	Mean		36.4	223	2.59	576	637	3.87	
	S.D.		4.9	47	0.58	100	372	0.41	
	N		10	10	10	10	10	10	
UVB+10	Mean		38.3	244	2.97	656	744	4.07	
	S.D.		5.4	31	0.58	113	213	0.50	
	N		10	10	10	10	10	10	
UVB+90	Mean		37.0	244	3.32	608	854	4.04	
	S.D.		3.2	52	1.68	79	349	0.43	
	N		10	10	10	10	10	10	

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Significantly different from 0 ppm group (Student's t test or Aspin-Welch test): *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 12 - 2 Organ weight - Group mean values in female mice
Relative weight to body weight(%) at terminal kill after 28 weeks of treatment

Dose (ppm)		Lung	Liver	Kidneys	Spleen	Gut
0	Mean	0.52	5.94	1.37	0.64	10.47
	S.D.	0.08	1.26	0.19	0.20	0.80
	N	9	10	10	10	10
90	Mean	0.52	5.68	1.34	0.57	10.63
	S.D.	0.07	0.34	0.07	0.17	1.01
	N	10	10	10	10	10
UVB+0	Mean	0.62 *	6.83	1.62 **	1.70 **	10.45
	S.D.	0.08	0.80	0.18	0.69	0.87
	N	10	10	10	10	10
UVB+1	Mean	0.61	7.04	1.58	1.68	10.72
	S.D.	0.09	0.79	0.12	0.80	1.27
	N	10	10	10	10	10
UVB+10	Mean	0.64	7.75	1.71	1.94	10.70
	S.D.	0.08	1.07	0.21	0.53	1.31
	N	10	10	10	10	10
UVB+90	Mean	0.66	9.05	1.64	2.28	10.96
	S.D.	0.12	4.93	0.16	0.84	1.22
	N	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Significantly different from 0 ppm group (Student's t test or Aspin-Welch test): *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 13 - 1 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female mice
Terminal kill after 28 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (ppm) No. of animals examined	0 23	90 22	UVB+0 23	UVB+1 23	UVB+10 23	UVB+90 23
Skin(lumbo-dorsal)(#) :	[N=]	10	10	10	10	10	10
Hyperplasia, epidermis		0	0	10 **	10	10	10
Skin(other sites)(#) :	[N=]	0 a	2 a	8 a	5 a	1 a	3 a
Erosion/ulcer		-	0	8	0	0	1
Cyst, epidermal		-	1	0	2	0	0
Abscess		-	0	0	2	1	1
Inflammation		-	0	0	1	0	0
Squamous cell carcinoma [Ma]		-	0	1	0	0	1
Spleen :	[N=]	10	11	22	22	23	23
Hyperplasia, lymphocyte		1	1	0	0	0	0
Hematopoiesis, extramedullary, increased		1	3	22 **	22	23	23
Splentitis		0	0	0	0	1	0
Lymph node :	[N=]	1 a	0 a	22 a	23 a	23 a	23 a
Lymphadenitis		1	-	22	23	23	23
Squamous cell carcinoma of skin, metastasis		0	-	1	0	0	1
Muscle :	[N=]	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	1 a
Abscess		-	-	-	-	-	1
Lung :	[N=]	10	11	10	10	10	10
Cellular infiltration, mononuclear cell		1	1	2	2	2	2
Cellular infiltration, neutrophil		0	0	0	1	2	0
Pneumonia		0	0	1	0	0	0
Adenocarcinoma [Ma]		0	1	0	0	0	0
Adenoma [Be]		0	0	0	0	0	1
Liver :	[N=]	10	11	11	11	15	13
Necrosis, hepatocyte, massive		0	0	2	3	6	4
Necrosis, hepatocyte, focal		1	1	1	3	5	3
Hematopoiesis, extramedullary, increased		2	2	7	9	9	11
Cellular infiltration, neutrophil		0	0	0	2	3	2
Abscess		0	0	0	0	0	1
Granuloma		0	1	0	0	0	0
Proliferation, bile duct		0	0	0	0	1	0
Gallbladder :	[N=]	10	10	10	10	10	9
Cholecystitis		0	1	0	0	0	0
Not in section		0	0	0	0	0	1
Kidney :	[N=]	10	10	10	10	10	10
Deposition, amyloid, glomerulus		1	0	0	0	0	0
Tubular basophilic change		1	1	0	1	2	3
Glomerulonephritis		1	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, mononuclear cell		4	6	7	10	9	7
Pyelitis/pyelonephritis		0	0	0	0	1	0
Ovary :	[N=]	1 a	2 a	0 a	1 a	0 a	0 a
Cyst		1	2	-	1	-	-
Uterine horn :	[N=]	1 a	0 a	0 a	0 a	0 a	1 a
Hyperplasia, endometrium		1	-	-	-	-	1
Eye :	[N=]	3 a	3 a	7 a	6 a	12 a	9 a
Cataract		0	1	1	5	3	1
Hyperplasia, corneal epithelial cell		0	0	7	4	10	9
Keratitis		2	3	7	6	12	9
Anterior synechia		1	2	0	1	2	2
Squamous cell carcinoma [Ma]		0	0	0	0	2	0
Hemangiosarcoma [Ma]		0	0	0	0	1	0
Abdominal cavity :	[N=]	0 a	0 a	1 a	0 a	0 a	0 a
Granuloma		-	-	1	-	-	-
Skin(abdominal) :	[N=]	10	10	10	10	10	10

[N=]: Number of animals examined at the site.

#: Lesions corresponding to masses that observed on the external surface of skin were not contained.

[Be]: Benign neoplasm; [Ma]: Malignant neoplasm.

Tissue(other sites): Tissues sampled from region(s) not designated in the protocol.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

Significantly different from 0 ppm group (Fisher's exact probability test): *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 13 - 2 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female mice
Killed *in extremis* or found dead

Site & Lesion	Dose (ppm)	0	90	UVB+0	UVB+1	UVB+10	UVB+90
	No. of animals examined	0	1	0	0	0	0
Systemic tumor :	[N=]	0	1	0	0	0	0
Malignant lymphoma [Ma]		0	1	0	0	0	0
Thymus :	[N=]	0	1	0	0	0	0
Lymph node :	[N=]	0	1	0	0	0	0

[N=]: Number of animals examined at the site.

[Be]: Benign neoplasm; [Ma]:Malignant neoplasm.

Table 13 - 3 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female mice
All animals examined

Site & Lesion	Dose (ppm)	0	90	UVB+0	UVB+1	UVB+10	UVB+90
	No. of animals examined	23	23	23	23	23	23
Systemic tumor :	[N=]	23	23	23	23	23	23
Malignant lymphoma [Ma]		0	1	0	0	0	0
Skin(lumbo-dorsal)(#) :	[N=]	10	10	10	10	10	10
Hyperplasia, epidermis		0	0	10 **	10	10	10
Skin(other sites)(#) :	[N=]	0 a	2 a	8 a	5 a	1 a	3 a
Erosion/ulcer		-	0	8	0	0	1
Cyst, epidermal		-	1	-	2	0	0
Abscess		-	0	-	2	1	1
Inflammation		-	0	-	1	0	0
Squamous cell carcinoma [Ma]		-	0	1	0	0	1
Spleen :	[N=]	10	11	22	22	23	23
Hyperplasia, lymphocyte		1	1	0	0	0	0
Hematopoiesis, extramedullary, increased		1	3	22 **	22	23	23
Splentitis		0	0	0	0	1	0
Lymph node :	[N=]	1 a	1 a	22 a	23 a	23 a	23 a
Lymphadenitis		1	0	22	23	23	23
Squamous cell carcinoma of skin, metastasis		0	0	1	0	0	1
Muscle :	[N=]	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	1 a
Abscess		-	-	-	-	-	1
Lung :	[N=]	10	11	10	10	10	10
Cellular infiltration, mononuclear cell		1	1	2	2	2	2
Cellular infiltration, neutrophil		0	0	0	1	2	0
Pneumonia		0	0	1	0	0	0
Adenocarcinoma [Ma]		0	1	0	0	0	0
Adenoma [Be]		0	0	0	0	0	1
Liver :	[N=]	10	11	11	11	15	13
Necrosis, hepatocyte, massive		0	0	2	3	6	4
Necrosis, hepatocyte, focal		1	1	1	3	5	3
Hematopoiesis, extramedullary, increased		2	2	7	9	9	11
Cellular infiltration, neutrophil		0	0	0	2	3	2
Abscess		0	0	0	0	0	1
Granuloma		0	1	0	0	0	0
Proliferation, bile duct		0	0	0	0	1	0
Gallbladder :	[N=]	10	10	10	10	10	9
Cholecystitis		0	1	0	0	0	0
Not in section		0	0	0	0	0	1
Kidney :	[N=]	10	10	10	10	10	10
Deposition, amyloid, glomerulus		1	0	0	0	0	0
Tubular basophilic change		1	1	0	1	2	3
Glomerulonephritis		1	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, mononuclear cell		4	6	7	10	9	7
Pyelitis/pyelonephritis		0	0	0	0	1	0
Ovary :	[N=]	1 a	2 a	0 a	1 a	0 a	0 a
Cyst		1	2	-	1	-	-
Uterine horn :	[N=]	1 a	0 a	0 a	0 a	0 a	1 a
Hyperplasia, endometrium		1	-	-	-	-	1
Eye :	[N=]	3 a	3 a	7 a	6 a	12 a	9 a
Cataract		0	1	1	5	3	1
Hyperplasia, corneal epithelial cell		0	0	7	4	10	9
Keratitis		2	3	7	6	12	9
Anterior synechia		1	2	0	1	2	2
Squamous cell carcinoma [Ma]		0	0	0	0	2	0
Hemangiosarcoma [Ma]		0	0	0	0	1	0
Abdominal cavity :	[N=]	0 a	0 a	1 a	0 a	0 a	0 a
Granuloma		-	-	1	-	-	-
Skin(abdominal) :	[N=]	10	10	10	10	10	10
Thymus :	[N=]	0 a	1 a	0 a	0 a	0 a	0 a

[N=]: Number of animals examined at the site.

#: Lesions corresponding to masses that observed on the external surface of skin were not contained.

[Be]: Benign neoplasm; [Ma]:Malignant neoplasm.

Tissue(other sites): Tissues sampled from region(s) not designated in the protocol.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

Significantly different from 0 ppm group (Fisher's exact probability test): *, p <=0.05; **, p <=0.01.

Table 14 Histopathology - Incidence of microscopic epidermal hyperplastic lesions(%) in female mice
Terminal kill after 28 weeks of treatment

Lesion	Dose (ppm)	UVB+0	UVB+90
No. of animals examined		10	10
No. of masses on the external surface of skin		106	166
Hyperplasia		2 (1.89)	0 (0.00)
Papilloma		1 (0.94)	3 (1.81)
Keratoacanthoma		0 (0.00)	1 (0.60)
Squamous cell carcinoma			
Type I (well differentiated type)		35 (33.02)	33 (19.88)
Squamous cell carcinoma			
Type II (moderately differentiated type)		67 (63.21)	123 (74.10)
Squamous cell carcinoma			
Type III (poorly differentiated type)		1 (0.94)	6 (3.61)

**

#: Corresponding to masses that observed on the external surface of skin.

Squamous cell carcinomas were classified by degree of differentiation.

Figure in parenthesis represents the ratio (%) to the total number of epidermal hyperplastic lesions in the group.

Significantly different from UVB+0 ppm group (Mann-Whitney *U* test): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Table 15 Determination of hepatic oxidative stress markers - Group mean values in female mice
After 28 weeks of treatment

Dose (ppm)	No. of animals examined		Lipid peroxide contents (nmol/g tissue)	8-OHdG (ng/mg DNA)
0	8	Mean	419	2.70
		S.D.	182	0.61
90	8	Mean	363	2.30
		S.D.	221	0.58
UVB+0	8	Mean	245 *	2.67
		S.D.	79	0.73
UVB+1	8	Mean	267	2.33
		S.D.	122	0.75
UVB+10	8	Mean	233	2.09
		S.D.	95	0.97
UVB+90	8	Mean	218	2.03
		S.D.	66	0.54

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from 0 ppm group (Student's t test or Aspin-Welch test): *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 16 Determination of skin oxidative stress markers - Group mean values in female mice
After 28 weeks of treatment

Dose (ppm)	No. of animals examined		Lipid peroxide contents (nmol/g tissue)	8-OHdG (ng/mg DNA)
0	8	Mean	344	3.26
		S.D.	223	0.25
90	8	Mean	230	2.80
		S.D.	101	0.65
UVB+0	8	Mean	340	2.30 **
		S.D.	187	0.17
UVB+1	8	Mean	270	2.58
		S.D.	116	0.32
UVB+10	8	Mean	336	2.91 ++
		S.D.	162	0.19
UVB+90	8	Mean	189	3.17 ++
		S.D.	88	0.62

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from 0 ppm group (Student's t test or Aspin-Welch test): *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Significantly different from UVB+0 ppm group (Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test): +, $p \leq 0.05$; ++, $p \leq 0.01$.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

平成 17 年度分担研究報告書

6. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）のラットにおける
急性経口毒性試験

分担研究者	小坂忠司	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室長
協力研究者	上田英夫	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室主任
	林 宏一	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室
	福山朋季	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室

研究要旨

Wistar 系ラットの雌性動物を用いて、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の急性経口毒性を検索した。各群 3 匹の動物を使用し、ACQ を 100、300、1000 mg/kg の 3 用量設定し、単回強制経口投与した。試験の結果、LD50 値の範囲は、300～1000mg/kg であり、OECD の定める GHS カテゴリーの 4（300-2000mg/kg）に位置し、毒物劇物法の分類では普通物に相当する LD50 値の範囲であると結論された。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤で銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の急性毒性を検索した。

B. 研究方法

試験方法は平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知「農薬の登録申請に係わる試験成績について」の「毒性に関する試験成績を作成するに当たっての指針」¹⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

本試験の被験物質は、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）であ

り、銅およびアルキルアンモニウムの各構成成分の配合比は、酸化銅（Ⅱ価、純度 99.3%、関東化学（株））55.6%およびアルキルアンモニウム（塩化ベンザルコニウム、純度 50%、和光純薬工業（株）/Avocado Research Chemicals Ltd）44.4%であった。受領した被験物質は湿度 40%以下の状態にて室温（許容範囲：15～30℃）で保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット（Br/Han:WIST@Jcl[GALAS]）の雌動物を用いた。供試動物は 6 週齢にて購入し、7 日間試験環境に馴化した後、7 週齢にて試験に供試した。馴化期間中毎日一般状態を観

察した。動物は温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間（オールフレッシュエアー方式）、照明時間 12 時間/日（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）に設定された動物飼育室で飼育した。馴化終了後、各用量群に 3 匹ずつ配分し使用した。飼料には保証飼料である固型飼料 MF（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、急速濾過・活性炭吸着装置を通した後、次亜塩素酸ナトリウムによって殺菌した井戸水を、プラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所に定める倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

試験群には 100、300 および 1000 mg/kg の 3 用量を設定した。1 用量につき 3 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量（100、300 および 1000 mg/kg）の被験物質投与液を投与前に調製した。投与液の調製に際し、成分ごとに純度による調製濃度の換算を実施した。投与容量は 4 mL/kg とした。所定量の銅および塩化ベンザルコニウムを秤量し、注射用水（大塚製薬株式会社）を加え定容し、スターラーにて攪拌して懸濁させた。

5. 投与方法

動物を投与前日の夕方より投与約 3 時間後まで絶食させた。投与液をスターラーで攪拌して均質な状態に保ち、注射筒内に吸い上げ胃ゾンデを用いて 1 回経口投与した。

6. 臨床症状の観察

投与当日は投与後 30 分および 4 時間後に、翌日から観察期間終了時までには 1 日 1 回、死亡の有無および動物の外貌、外皮、姿勢、行動、呼吸、意識、神経症徴候、体温、排泄等について詳細に観察した。観察期間は投与後 14 日間とした。

7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7、14 日および死亡発見時に個体別に測定した。

8. 剖検

死亡動物は発見時に、観察期間終了時（投与後 14 日）の生存動物は、エーテル麻酔により安楽死させ、解剖して肉眼的異常の有無を検索した。

9. 半数致死量（LD50 値）の算出

観察終了時（投与後 14 日間）までの累積死亡率に基づき、LD50 値の範囲を決定した。

C. 研究結果

1. 死亡率および LD50 値

死亡率を表 1 に示す。

死亡率は、100、300 および 1000 mg/kg 群の順にそれぞれ 0/3、1/3 および 3/3 であった。

これらの死亡率から、LD50 値の範囲は、300~1000mg/kg であると考えられた。

2. 体重測定

体重測定結果を表 2 に示す。

投与後 7 日および 14 日の全生存例の体重値は、投与前の体重値と比べて順調に増加していた。

3. 臨床症状

臨床症状の結果を表 3 に示す。

300 および 1000mg/kg 投与群で認められた死亡動物において、沈静、筋力低下、体温低下、流涎、口周囲部および外陰部被毛の汚れ等が認められた。観察終了時（投与 14 日目）まで生存した動物では、毒性徴候を示す臨床症状は観察されなかった。

4. 剖検所見

剖検所見を表 4 に示す。

死亡例の肉眼的所見として、胃のガス貯留および赤色あるいは黒色内容物、腸管の液状貯留物が認められた。観察終了時（投与 14 日）に行った生存動物の剖検では、肉眼的異常は認められなかった。

D. 考察

ACQ の急性経口毒性を検索するために、Wistar Hannover 系雌ラットについて検索した。臨床症状の観察では、沈静、筋力低下、体温低下、流涎、口周囲部の被毛の汚れおよび外陰部の被毛の汚れ等の一般状態の悪化を示す症状が認められた。死亡例の剖検では、主として急性毒性試験においてしばしば認められる、消化管の変化が観察された。これらのことから、ACQ 投与に起因する特徴的な所見は認められなかった。

ACQ 投与における死亡率は 100、300 および 1000mg/kg 投与群の順にそれぞれ 0/3、1/3 および 3/3 であった。よって Wistar hannover 系雌ラットの LD50 値の範囲は 300~1000mg/kg であると考えられた。

この結果は、OECD（経済協力開発機構）の定める GHS（Globally Harmonised System）カテゴリー²⁴（LD50 値は

300-2000mg/kg）と判定され、毒物劇物法の分類では普通物に相当する LD50 値の範囲であった。

E. 結論

本実験条件下において、ACQ の急性経口毒性は OECD の定める GHS カテゴリー 4 に位置し、毒物劇物法の分類の普通物に相当する LD50 値の範囲であると結論された。

F. 引用文献

- 1) 農薬の登録申請に係わる試験成績について、（監修）農林水産省，12 農産第 8147 号（平成 12 年 11 月 24 日）
- 2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Adapted: December 17, 2001.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1 Mortality - Female rats

Dose (mg/kg)	Time after administration								Final mortality					
	30 min	4 hrs	1	2	3	4	5	6		7	8-14 days			
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 ^a
300	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
1000	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3

^a: Cumulative number of animals found dead during the observation period per number of animals treated.

Table 2 Clinical observation - Incidence of signs in female rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)					
	100		300		1000	
Fate	fd	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	3	1	2	3	0
No abnormalities detected	-	3	0	2	1	-
Sedation	-	0	1	0	0	-
Muscle weakness	-	0	1	0	0	-
Hypothermia	-	0	1	0	0	-
Salivation	-	0	1	0	2	-
Soiled fur in the perioral region	-	0	1	0	0	-
Soiled fur in the external genital region	-	0	1	0	0	-

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.