最 終 報 告 書

1,2－ジクロロ－3－ニトロベンゼンの
ラットを用いた経口投与による反復投与
毒性・生殖発生毒性併合試験
（試験番号　91－024）

財団法人　畜産生物科学安全研究所

目　　次

要約 …… 1
試験目的 …… 2
試験材料及び方法
1．被験物質 …… 2
2．供試動物 …… 2
3．飼育条件 …… 2
4．試験群の構成及び投与量の設定 …… 3
5．被験物質の調製 …… 3
6．交配方法 …… 4
7．観察及び検査
1）親動物に関する項目
（1）一般状態観察 …… 4
（2）体重及び摂餌量測定 …… 4
（3）臨床病理学的検査 …… 5
（4）病理学的検査 …… 6
（5）生殖能に関する指標の算出 …… 7
2）新生児に関する項目
（1）産児数及び性比の観察 …… 8
（2）外表異常及び一般状態の観察 …… 8
（3）体重測定 …… 8
（4）病理学的検査 …… 8
8，統計処理 …… 8
試験結果
I．反復投与毒性
1．一般状態 …… 9
2．体重 …… 9
3．摂餌量 …… 9
4．尿所見 …… 10
5．血液学的所見 …… 10
6．血液生化学的所見 …… 10

7．病理学的所見
1）剖検所見 …… 10
2）臓器重量 …… 11
3）病理組織学的所見 …… 11
Ⅱ．生殖発生毒性
1．親動物の生殖に及ぼす影響
1）交尾率，受胎率，出産率及び妊娠期間 …… 12
2）黄体数，着床数及び着床率 …… 12
2．新生児に及ぼす影響
1）一般状態 …… 13
2）出産児数，生存児数，死亡児数，性比及び生存児体重 …… 13
3）分娩率，出生率及び生存率 …… 13
4）新生児の外表及び内臓異常 …… 13
考察 …… 13
文献 …… 15

添付資料

A．図・表・写真

Figures 1，2　体重
Figures 3，4　摂餌量
Tables 1，2　一般状態
Tables 3，4　体重
Tables 5，6　摂餌量
Table 7　尿所見
Table 8　血液学的所見
Table 9　血液生化学的所見
Tables 10，11　剖検所見
Tables 12～15　臓器重量
Tables 16，17　病理組織学的所見
Table 18　生殖に及ぼす影響
Table 19　新生児に及ぼす影響
Table 20　新生児の外表及び内臓異常

要約

高生産量既存化学物質１,2－ジクロロ－３－ニトロベンゼン（ＤＣＮＢ）の毒性を検討するため，SD 系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用いて，反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。ラットは１群雌雄各 10 匹とし，ＤＣＮＢの０(溶媒投与の対照)，1，5，25 及び 100 mg/kg/日用量を，交配開始 14 日前から，雌は分娩後哺育３日目(39～44日間)まで，雄は44 日間，毎日強制的に経口投与した。得られた結果は，次のとおりである。

反復投与毒性

雄親において，１及び５mg/kg 群では，被験物質投与の影響は認められなかった。25 mg/kg 群では肝臓の肝細胞腫大及び腎臓の尿細管上皮に硝子滴が認められ，肝臓及び腎臓重量は増加した。また脾臓にヘモジデリン沈着の増加が認められた。これらの変化に加えて，100 mg/kg 群では，腎臓において障害後の尿細管の修復像と考えられる変化が目立ち，尿タンパクや血清ナトリウム，タンパク及び総コレステロール量の増加並びに尿素窒素量の減少が認められ，体重増加は抑制された。さらに，血色素濃度及びヘマトクリット値の減少並びに網状赤血球数の増加が認められ，溶血性貧血の所見を呈した。雌親においても，25 mg/kg 以上の用量群で，同様に肝臓，腎臓及び脾臓に病理組織学的変化が認められたが，腎臓の変化は雄親と異なり，尿細管上皮の空胞化を特徴とする変化であった。また，100 mg/kg 群では，胸腺の萎縮例が対照群に比べて増加する傾向にあった。しかし，雄親，雌親とも，一般状態の変化や死亡はみられず，摂餌量も 100 mg/kg 群で投与開始後短期間内に一過性の減少を認めたのみで，その後は対照群と著差はなかった。

生殖発生毒性

１，５，25 及び 100 mg/kg 群とも，交配，授胎，妊娠及び分娩は順調で，対照群と比べ観測した各指標に統計学的有意差は認められなかった。また，新生児についても，発生毒性を示唆する変化は認められなかった。

以上の結果から，ＤＣＮＢ投与により生殖や発生に対する明らかな影響は認められなかったものの，肝臓及び腎臓に対する毒性影響や溶血性貧血が発現することが明らかとなった。また，無影響量は，５mg/kg/日であると推定された。

試験目的

この試験は，ＯＥＣＤにおける高生産量既存化学物質の安全性点検プログラムの一環として実施したものであり，1,2 -ジクロロ-3- ニトロベンゼンを雌雄ラットに反復経口投与し，投与期間中に交配，妊娠及び分娩させ，本物質の反復投与毒性並びに生殖・発生毒性をスクリーニング的に検討するために行った。

試験材料及び方法

1．被験物質（Appendices 1,2）

被験物質 1,2 -ジクロロ-3- ニトロベンゼン（ＣＡＳ No. 3209-22-1，以下ＤＣＮＢと略す）は，　　から提供されたもの（ロット番号　　純度 99.15%）を用いた。ＤＣＮＢの詳細は Appendix 1 に示したとおりである。

なお，試験に用いたＤＣＮＢについては，投与開始前及び投与終了後に分析し，使用期間中安定であったことを確認した(Appendix 2)。

2．供試動物

動物は，ＳＤ系〔Ｃｒｊ：ＣＤ（ＳＤ）〕のＳＰＦラットを用いた。ラットは，日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県厚木市下古沢７９５番地）から，雄は７週齢，雌は８週齢で購入（雄 62 匹，雌 62 匹）し，７日間試験環境に馴化させ，その間に検疫を行い，発育が順調で一般健康状態の良好な雌雄各 50 匹を，雄は８週齢，雌は９週齢で試験に供した。投与開始時の平均体重（体重範囲）は，雄 335 (324～349)g，雌 228 (217～ 242)g であった。

3．飼育条件（Appendices 3～6）

ラットは，馴化及び投与期間を通じて，温度 22 ± 3℃，湿度 55 ± 10 %，換気回数10回以上/時(オールフレッシュエアー方式)，照明 12 時間(午前６時点灯，午後６時消灯）に設定したバリアーシステム動物室で，個体別にステンレス製金網ケージ〔276 W × 426 D ×200 H (mm)〕に収容し，これをステンレス製５段のラックに配して飼育した。ただし，交尾確認後の雌は，床敷(日本チャールス・リバー株式会社製，ホワイトフレーク，汚

染物質の分析結果：Appendix 3）を入れたポリカーボネート製ケージ〔265 W ×426 D ×200 H(mm)〕に収容した。

飼料(日本クレア株式会社製，固型飼料ＣＥ－２，汚染物質の分析結果：Appendix 4)と水（神奈川県営水道水を１μmカートリッジフィルター濾過後紫外線照射して使用，汚染物質の分析結果：Appendix 5）は，それぞれ給餌器及び自動給水装置又は給水瓶（ポリカーボネート製ケージの場合）により自由摂取させた。

ラットの個体識別は，ラック及びケージへの標識札の貼付と耳介パンチ法により行った。

なお，動物の飼育期間を通じて，試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化（温度・湿度の測定結果：Appendix 6）は認められなかった。

４．試験群の構成及び投与量の設定

投与量は，投与量設定試験の結果に基づいて設定した。投与量設定試験は，６週齢のＳＤ系〔Ｃｒｊ：ＣＤ（ＳＤ）〕ラットを１群雌雄各４匹とし，溶媒投与の対照群，並びにＤＣＮＢの５，10，25，50 及び 100 mg/kg/日投与群の６群を設け，14 日間の反復経口投与により実施した。

その結果，10 ないし 25 mg/kg/日以上の用量群で肝臓重量の増加が，100 mg/kg/日群で血清総タンパク及び総コレステロール量の増加がいずれも雌雄に共通して認められた。

以上の結果から，本試験における投与量は，親ラットに毒性徴候が発現すると考えられる 100 mg/kg/日を最高用量とし，以下 25，5 及び 1 mg/kg/日の４用量を設定した。

試験群の構成は，①溶媒投与群(以下，対照群)，②DCNB 1 mg/kg/日投与群(1 mg/kg群)，③同 5 mg/kg/日投与群(5 mg/kg群)，④同 25 mg/kg/日投与群(25 mg/kg 群)，③同 100 mg/kg/日投与群(100 mg/kg群）の５群とした。

各群の動物数は，雌雄各 10 匹とし，各群への動物の割り付けは，投与開始日の体重に基づく層化無作為抽出法を用いて行った。

５．被験物質の調製（Appendices 7,8）及び投与方法

DCNB は，溶媒として局方オリーブ油（宮澤薬品株式会社製，製造番号 KD 04，KG 17，KI17)を用い，所定の投与用量になるような濃度(１mg/kg 群：0.02 w/v %，5 mg/kg群：

0.1w/v %, 25 mg/kg群： 0.5 w/v %, 100 mg/kg 群： 2.0 w/v %))の溶液として調製した。投与液量は体重1kg当たり5mℓとし，各個体の投与液量は，至近日に測定した体重を基に算出した。

なお，DCNB は投与液中に均一に分散し，さらに冷所(4℃)・遮光下で少なくとも 14 日間は安定であることが確認された（Appendix 7）ので，投与液の使用期間は 14 日間とし，使用時まで冷所・遮光下で保存した。また，投与液は調製後分析し，所定濃度で調製されていることを確認(Appendix 8)した。

投与方法は，胃ゾンデと注射筒を用いて，上述の投与液を，雌雄とも交配開始 14 日前から，雄は 44 日間，雌は出産後の哺育3日目(39 ～44日間)まで，1日1回，定時(午前 10 時～12 時，ただし投与8日目のみ午後1時30分～2時15分）に，ラットの胃内に強制的に投与した。対照群には，溶媒を同様に投与した。

6．交配方法

交配前の投与終了後（投与開始後 14 日目の午後)，雄のケージに同一群内の雌を入れて1対1の組み合わせを作り，交尾が確認されるまで(5日間で全例の交尾を確認)， 連続同居させた。交尾の確認は毎朝一定時刻(9:30 頃）に行い，膣栓形成あるいは膣垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。

7．観察及び検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日，動物の生死，外観，行動等について観察した。特に繁殖期においては，妊娠，出産及び哺育の状態を注意深く観察した。分娩の確認は毎朝一定時刻（9:30頃）に行い，1腹ごとに全例の出産が確認された日を哺育1日とした。

(2) 体重及び摂餌量測定

体重の測定は，個体ごとに投与開始日(投与開始直前)及びその後は7日間隔で行い，さらに最終投与日と屠殺日にも測定した。ただし，雌の妊娠後は，妊娠0，7，14 及び 20 日と哺育1日及び4日に測定した。摂餌量は，体重測定日に合わせて，ケージごとに翌朝ま

での 24 時間の飼料消費量を測定した。雌の哺育4日の摂餌量は，前日からの 24 時間消費量を測定した。これらの測定には，電子上皿天秤（メトラー社製，PL-3000)を用いた。

(3) 臨床病理学的検査

雄のみについて，以下の検査を実施した。

a. 尿検査 ： 投与開始 42 日目に，腰背部を圧迫刺激して新鮮尿を採取し，試験紙法（マルティスティックス®；マイルス・三共株式会社）により，pH，潜血，タンパク，糖，ケトン体，ビリルビン及びウロビリノーゲンを定性的に検査した。

b. 血液学的検査：供試血液の採取は，投与期間終了翌日(投与開始 45 日目）の解剖直前に行った。動物は前日の午後5時より絶食し水のみを与えた。採血はエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行い，次の項目について測定した。凝固阻止剤はＥＤＴＡ－２Ｋを用いた。

項目（略号）	測定法	測定機器
①赤血球数(RBC)	電気抵抗検出方式	多項目自動血球計数装置〔E-4000 :東亜医用電子（株)〕
②血色素量(Hb)	オキシヘモグロビン法	
③ヘマトクリット値(Ht)	パルス検出方式	
④平均赤血球容積(MCV)	計算値	
⑤平均赤血球血色素量(MCH)	計算値	
⑥平均赤血球血色素濃度(MCHC)	計算値	
⑦白血球数(WBC)	電気抵抗検出方式	
⑧血小板数(Plat.)	電気抵抗検出方式	
⑨網状赤血球数(Ret.)	Brilliant cresyl blue 染色した塗抹標本の鏡検	

なお，白血球百分率算定用に血液塗抹標本を作製したが，白血球数に変化が認められなかったので，観察は実施しなかった。

c. 血液生化学的検査：採取した血液の一部から血清を分離し，次の項目を測定した。

項目（略号）	測定法	測定機器
① 総タンパク（T.P.）	Biuret 法	生化学自動分析装置〔JCA-VX-1000 型クリナライザー：日本電子(株)〕
② アルブミン（Alb.）	BCG 法	
③ A／G比（A/G）	計算値	
④ 血糖（Glu.）	酵素法（GK[1)]-G6PDH[2)]-UV 法）	
⑤ トリグリセライド（T.G.）	酵素法（LPL[3)]-GPO[4)]-POD[5)] 系）	
⑥ 総コレステロール（T-Cho.）	酵素法（CES[6)]-COD[7)]-POD 系）	
⑦ 総ビリルビン（T-Bil.）	Jendrassik 法	
⑧ 尿素窒素（BUN）	Urease-UV 法	
⑨ クレアチニン（Crea.）	Jaffé 法	
⑩ GOT（GOT）	SSCC[8)] 法	
⑪ GPT（GPT）	SSCC 法	
⑫ γ－GTP（γ-GTP）	SSCC 法	
⑬ ALP（ALP）	GSCC[9)] 法	
⑭ カルシウム（Ca）	OCPC 法	
⑮ 無機リン（P）	酵素法（PNP[10)]-XOD[11)]-POD 系）	
⑯ ナトリウム（Na）	イオン電極法	電解質自動分析装置〔NAKL-1：東亜電波工業(株)〕
⑰ カリウム（K）	イオン電極法	
⑱ 塩素（Cl）	イオン電極法	

1）グルコキナーゼ，2）グルコース6リン酸脱水素酵素，3）リポプロテインリパーゼ，4）グリセロリン酸酸化酵素，5）ペルオキシダーゼ，6）コレステロールエステラーゼ，7）コレステロールオキシダーゼ，8）スカンジナビア臨床化学会，9）ドイツ臨床化学会，10）プリンヌクレオシドホスフォリラーゼ，11）キサンチンオキシダーゼ

(4) 病理学的検査

雄は採血に続いて，また雌は哺育4日目にエーテル麻酔下で，いずれも放血屠殺し，次の項目を検査した。分娩予定日を過ぎても分娩が認められない雌については，分娩予定の4日後（妊娠 25 日目）に屠殺し，検査に供した。

a. 剖検：全身臓器を肉眼的に観察した。さらに，雌については，卵巣の黄体数及び子宮の着床痕の数を調べた。

b. 臓器重量測定：電子上皿天秤（メトラー社製，AT 200）を用いて，雌雄の肝臓，腎臓，胸腺並びに雄の精巣，精巣上体を秤量（絶対重量）し，対体重比（相対重量）を算出した。腎臓，精巣及び精巣上体は，左右を一括して秤量した。

c. 病理組織学的検査：次の臓器を採取し，10% 中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣及び精巣上体のみブアン液）で固定した。

脳，下垂体，眼球，ハーダー腺，甲状腺(上皮小体を含む)，唾液腺，胸腺，気管，肺（気管支を含む)，心臓，舌，食道，胃，腸，肝臓，脾臓，膵臓，副腎，腎臓，膀胱，精巣，精巣上体，前立腺，精嚢，卵巣，子宮，膣，大動脈(胸部),脊髄（頸膨大部，腰膨大部)，坐骨神経，骨・骨髄(胸骨，大腿骨)， リンパ節(頸部リンパ節，腸間膜リンパ節),骨格筋(下腿三頭筋)，皮膚(背部)，乳腺(腹部)

病理組織学的検査は，対照群と最高用量 100 mg/kg群の肝臓，腎臓，副腎，脳，心臓，脾臓，胸腺，骨髄並びに精巣あるいは卵巣について行った。1，5及び 25 mg/kg 群では，最高用量群で変化の認められた雌雄の肝臓，腎臓，脾臓並びに雌の胸腺を検査した。さらに，全ての群の不妊のつがいでは，対照群及び最高用量群で検査した臓器に加えて，下垂体並びに精巣上体，精嚢，前立腺あるいは子宮，膣も検査した。

なお，病理組織標本の作製は，株式会社組織科学研究所（東京都青梅市黒沢２丁目984 －１番地）に委託して実施し，常法に従いパラフィン切片を作製し，H-E 染色を施した。また，一部の例の肝臓及び腎臓について脂肪染色（ズダンⅢ染色),腎臓について PAS 染色，脾臓について鉄染色（ベルリンブルー染色）を行った。

(5) 生殖能に関する指標の算出

生殖能に関する各指標は，次のように算出した。

a. 交尾率（%）＝（交尾成立動物数／同居動物数）×１００

b. 着床率（%）＝（着床痕数／黄体数）×１００

c. 受胎率（%）＝（受胎雌数／交尾成立雌数）×１００

d. 妊娠期間（日）＝妊娠０日から出産が確認された朝の前日までの期間

e. 出産率（%）＝（生児出産雌数／生存妊娠雌数）×１００

f. 生存率（%）＝（生存妊娠雌数／妊娠雌数）×１００

2) 新生児に関する項目

(1) 産児数及び性比の観察

分娩完了の確認後各腹の産児数（生存児と死亡児の合計）を調べ分娩率を算定した。

分娩率（%）＝（総出産児数／着床痕数）×１００

また，性は肛門と生殖突起の距離の長短により判定し，群ごとの性比を算出した。

(2) 外表異常及び一般状態の観察

分娩完了後，口腔内を含む外表の異常を観察した。また，毎日一般状態及び生死を確認し，出生率及び新生児生存率を求めた。

出生率（%）＝（出産確認時生存児数／総出産児数）×１００

新生児生存率（%）＝（哺育４日生存児数／出産確認時生存児数）×１００

(3) 体重測定

生存児について哺育１日及び４日に，雌雄別に各腹ごとの総体重を測定し，１匹当たりの平均体重を算出した。

(4) 病理学的検査

死亡例はその都度，生存例は親ラットの解剖時(哺育４日）にエーテル・クロロホルムで麻酔死させ，胸腹部における主要臓器を肉眼的に観察した。

8．統計処理

得られた平均値あるいは頻度について，対照群との間の有意差（危険率５%以下）を次の方法で検定した。

体重，摂餌量，血液学的及び血液生化学的データ，臓器重量，黄体数，着床痕数，妊娠期間，産児数，生存児数，死亡児数などのパラメトリックデータはBartlettの分散検定を行った。分散が一様な場合は一元配置の分散分析を行い，その結果有意差を認めた場合，Dunnett法又はScheffé 法（群の大きさが異なる場合）により対照群に対する各群の比較検定を行った。分散が一様でない場合は，ノンパラメトリックデータに用いる検定法に従った。

着床率，出生率，分娩率，新生児生存率，尿検査の定性的データなどのノンパラメトリッ

クデータは Kruskal Wallis の順位検定を行い，その結果有意差を認めた場合，Dunnett 型又は Scheffé 型（群の大きさが異なる場合）の検定により対照群に対する各群の比較検定を行った。妊娠雌の生存率，交尾率，受胎率，出産率，出産児の性比，病理学的検査等における異常例の出現率などのカテゴリカルデータは χ^2 検定を行った。

試験結果

I．反復投与毒性

親ラットの反復投与毒性に関する観察及び検査結果は，次のとおりであった。

1．一般状態（Tables 1,2, Appendices 9,10)及び死亡

観察期間を通じて，各群の親ラットに死亡は認められず，また，被験物質投与との関連性が考えられる一般状態の変化も認められなかった。

ただし，対照群の雄の1匹(No.003)は，投与開始 31 日目頃から上顎の左右切歯にぐらつきがみられ，34 ないし 35 日目にかけて両側とも脱落した。これにより，摂餌量が著減し，体重も減少したが，その後新しい歯の萌出に伴ない，摂餌量も回復し，観察期間終了時では萌出した歯はほぼ通常の長さにまで成長した。また，紅涙による眼瞼周囲被毛の汚染が 25 mg/kg 群の雄の1匹(No.039)に認められた。

2．体重（Figures 1,2, Tables 3,4, Appendices 11,12)

被験物質投与各群の雄の体重は，観察期間を通じて対照群を下回って推移した。このうち，1，5及び 25 mg/kg 群の体重は統計学的に有意な変化ではなかったが，100 mg/kg 群の体重は投与開始 36 日目以降有意に減少し，体重増加の抑制が認められた。また，25 mg/kg 群の体重も1及び5mg/kg 群をやや下回り，体重増加の抑制傾向がうかがわれた。被験物質投与各群の雌の体重は，対照群と差は認められなかった。

なお，切歯の脱落がみられた対照群の1匹の体重及び後述の摂餌量は，統計処理の対象から除外した。

3．摂餌量（Figures 3,4, Tables 5,6, Appendices 13,14)

1，5及び 25 mg/kg 群では，雌雄とも観察期間を通じて被験物質投与の影響が考えられ

る摂餌量の変動は認められなかった。なお1mg/kg 群の雄の投与 36 日目の摂餌量は対照群に比べて有意に少なかったが，その前後の摂餌量に変化はみられず，また用量依存性傾向のない変化であった。100 mg/kg 群では，雌雄とも投与1日目の摂餌量が有意に減少した。しかし，8日目以降は特に明らかな変動は認められなかった。

4．尿所見（Table 7，Appendix 15）

雄において，1，5及び 25 mg/kg 群では各検査項目に変化は認められなかった。100 mg/kg 群では尿タンパクが有意に増加し，またpHは低下傾向にあった。

5．血液学的所見（Table 8，Appendix 16，バックグランドデータ:Appendix 28）

雄において，1，5及び 25 mg/kg 群では各検査項目に変化は認められなかった。100 mg/kg 群では，有意な血色素濃度及びヘマトクリット値の減少並びに網状赤血球数の増加がみられ，赤血球数，平均赤血球血色素量及び平均赤血球血色素濃度も統計学的有意差は認められなかったものの減少傾向にあった。

6．血液生化学的所見（Table 9，Appendix 17，バックグランドデータ:Appendix 28）

雄において，1及び5mg/kg 群では各検査項目に変化は認められなかった。25 及び 100 mg/kg群では総タンパク，総コレステロール及びナトリウム量の有意な増加が，100 mg/kg 群では尿素窒素量の有意な減少が認められた。また，ごく軽度な変化であったが，100 mg/kg 群の GOT，GPT 及びγ-GTP 活性は上昇傾向を，カリウム量は減少傾向を示した。総タンパク量の増加については，主にアルブミン量の増加によるものであったが，A/G 比には有意な変化は認められなかった。

7．病理学的所見

1）剖検所見（Tables 10,11，Appendices 18,19）

被験物質投与の影響と考えられる変化として，肝臓の腫大，腎臓の腫大及び黒褐色化，並びに胸腺の萎縮が認められた。腎臓の腫大が5mg/kg 群の雌の1匹にみられたのを除いて，肝臓及び腎臓の腫大は，雌雄とも 25 mg/kg 以上の用量群で用量依存的に認められ，特に100

mg/kg群の雌の肝臓の変化は，雄に比べてやや強い傾向にあった。また，腎臓の色調がやや黒味をおびて黒褐色化する例が，雄の 100 mg/kg 群と雌の 25 及び100 mg/kg 群で認められた。さらに，雌の妊娠例において，胸腺が他に比べてやや小さく，萎縮傾向にある例が各群に散発したが，特に 100 mg/kg群における発現率が他の群に比べて高かった。

なお，各群に認められた不妊動物において，生殖器系臓器には特に異常は認められなかった。

2）臓器重量（Tables 12～15,Appendices 20～23）

1及び5 mg/kg群では，雌雄とも測定した各臓器の絶対及び相対重量に明らかな変化は認められなかった。25 mg/kg 群では，雄の肝臓及び腎臓の相対重量並びに雌の肝臓の絶対及び相対重量の有意な増加が認められ，雌の腎臓の絶対及び相対重量も増加傾向を示した。100 mg/kg 群では，雌雄とも肝臓及び腎臓の絶対及び相対重量の有意な増加が認められた。また，統計学的有意差は認められなかったが，雌の胸腺は絶対及び相対重量とも減少傾向を示した。なお，雄において 25 及び 100 mg/kg 群の精巣及び 100 mg/kg 群の精巣上体は，絶対重量では変化は認められなかったが，相対重量では対照群に比べて統計学的に有意な高値を示した。

3）病理組織学的所見（Tables 16,17, Photos 1～16, Appendices 18,19）

被験物質投与の影響は，肝臓，腎臓，脾臓及び胸腺に認められた。生殖毒性と関連する変化については，不妊例においても生殖器系臓器や内分泌系臓器に異常は認められなかった。

a．肝臓（全群の雌雄を検査）：肝細胞の腫大が 25 及び 100 mg/kg 群の雌雄に多発した。この肝細胞の腫大は小葉中心性に発現し，腫大した細胞の細胞質は好塩基性が低下していた。変化の強い例では胞体は明るくぬけて膨化し，風船細胞様の像を呈した。雌の変化は雄に比べてやや強い傾向にあった。

なお，対照群の雄において，肝細胞中の脂肪滴がやや目立つ例が多かった。

b．腎臓（全群の雌雄を検査）：雄は主に近位尿細管上皮における PAS 染色陽性硝子滴の出現が，雌は尿細管上皮の空胞化がいずれも 25 及び 100 mg/kg 群で認められた。空胞化した尿細管上皮は，比較的大型の空胞が充満して膨化していた。また，100 mg/kg 群の雄では，やや萎縮し，多核で好塩基性の上皮細胞から成り，障害後の再生像と考えられる尿細管の目立つ例が増加する傾向にあった。なお，硝子滴と同様にエオジンに好染するが，大型

で PAS 染色陰性の好酸性小体(eosinophilic body)は，対照群を含む各群の雄に認められたが，被験物質投与による発現率の増加はみられなかった。

c．脾臓（全群の雌雄を検査）：脾臓の赤脾髄には，生理的にもヘモジデリンの沈着や髄外造血巣がみられるが，25 mg/kg 及び 100 mg/kg 群の雌雄ではこのヘモジデリンの沈着が増加し，また 100 mg/kg 群の雄では少数ながら髄外造血巣の増加例も認められた。

d．胸腺（対照及び 100 mg/kg 群の雌雄並びに 1，5，及び 25 mg/kg 群の雌を検査）：剖検において，胸腺が小さく，萎縮と記録された例が各群の雌に散発したが，これらの例ではリンパ球が減少し，そのため皮髄の境界が不明瞭となり，組織学的にも萎縮していることが確認された。

e．副腎・脳・心臓・骨髄・精巣又は卵巣（対照及び 100 mg/kg 群の雌雄並びに 1，5，及び 25 mg/kg 群の妊娠しなかったつがいを検査）：被験物質投与の影響が考えられる変化は認められなかった。

f．下垂体と精巣上体・精嚢・前立腺又は子宮・膣（全群の妊娠しなかったつがいを検査）：異常は認められなかった。

なお，これらの所見以外にも，各臓器に変化が認められたが，いずれも発現率に用量依存性傾向は認められず，偶発的と考えられる変化であった。

Ⅱ．生殖発生毒性

生殖発生毒性に関する観察及び検査結果は，次のとおりであった。

1．親動物の生殖に及ぼす影響（Table 18，Appendix 24）

1）交尾率，受胎率，出産率及び妊娠期間

交尾率及び出産率は，ともにすべての投与群で 100% であった。受胎率は，対照群並びに1，5，25 及び 100 mg/kg/日投与群でそれぞれ10 匹中2，3，1，2及び2匹の不妊娠動物がみられたため，それぞれ 80，70，90，80 及び 80% であったが，対照群と被験物質投与各群との間に有意差はなかった。妊娠期間は，対照群では平均 22 日であり，被験物質投与各群においても著差はなかった。

2）黄体数，着床数及び着床率

いずれの指標についても，対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められな

かった。

2．新生児に及ぼす影響(Tables 19, 20, Appendices 25～27)

1）一般状態

対照群を含む全ての群において，生存児の生後4日目までの一般状態に異常は認められなかった。

2）出産児数，生存児数，死亡児数，性比及び生存児体重

いずれの指標についても，対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。なお，性比は5及び 100 mg/kg 群では雄に比べ雌が多く，25 mg/kg 群では逆に少なかったが，用量に依存した一定の変化傾向でなかった。生存児体重については，生後1日目から4日目の間にいずれの群においても同程度の順調な増加がみられた。

3）分娩率，出生率及び生存率

いずれの指標についても，90% 以上の高値を示し，対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

4）新生児の外表及び内臓異常

外表異常は，1 mg/kg 群で無尾及び鎖肛を呈する重複異常児が1例みられた以外，いずれの投与群にも異常例は観察されなかった。内臓異常は，すべての投与群において認められなかった。また，内臓変異についても，変異を有する生存児の平均発現率が対照群の 5.0% に対し，被験物質投与群では5.9～8.6% の範囲にあり，有意な増加は認められなかった。対照群及び被験物質投与群でみられた変異例は，胸腺の頚部残留と左臍動脈遺残であった。

考察

ＤＣＮＢのラットを用いた経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験において認められた主な変化は，肝臓及び腎臓に対する影響並びに貧血所見であり，生殖・発生毒性を示唆する明らかな変化は認められなかった。

肝臓に対する影響としては，肝細胞が小葉中心性に腫大して肉眼的にも肝臓は大きくなり，肝臓重量は増加した。

これとの関連性が考えられる変化として，アルブミンを含む血清総タンパク量は増加し，

逆に尿素窒素量は減少するなど，肝臓におけるタンパク代謝の異常を示唆する変化が認められた。また，総コレステロール量の増加についても，腎臓等に対する影響によるよりもむしろ肝機能の異常と関連した変化と解せられる。さらに，統計学的には有意な変化でなかったものの，血清 GOT，GPT 及びγ-GTP 活性はわずかに上昇傾向を示し，肝臓にみられた病理学的変化は，軽度ながらも機能障害を伴う変化であることがうかがわれた。

腎臓に対する影響としては，雄は尿細管上皮に硝子滴が出現し，さらに対照群にも認められ，障害された尿細管の修復像と考えられる変化が増加した。一方，雌では，雄でみられた変化は発現しなかったが，尿細管上皮の空胞化がみられ，雌雄とも腎臓の肉眼的な腫大例や重量の増加傾向が認められた。

また，尿タンパクや血清ナトリウム量の増加及びカリウム量の減少傾向も腎機能に対する影響を示唆する変化と解せられる。

尿細管上皮の硝子滴は雄ラットでは加齢に伴い生理的にも認められ，タンパクの再吸収像と考えられている。ＤＣＮＢ投与によって発現した硝子滴は，おそらく血清タンパクの増加と関連した変化と推察される。

なお，ＤＣＮＢ投与動物の腎臓の色調は，通常の褐色に対しやや黒味を帯び，黒褐色化していたが，これは腎臓の形態的変化とは無関係な，おそらくＤＣＮＢの代謝物による着色によるものと推察される。

貧血所見として，雄ラットの赤血球数，血色素濃度及びヘマトクリット値は減少ないし減少傾向を示した。この貧血は，造血能低下によるものではなく，血中の網状赤血球数増加や脾臓の髄外造血巣増加例が認められ，しかも脾臓にヘモジデリン沈着の増加が認められたことから，溶血性貧血であると判断される。

胸腺の萎縮例が雌において増加する傾向が認められた。出産した雌の胸腺は雄に比べて萎縮ぎみで，萎縮性変化が発現し易いものと推察されるが，いずれにしても，毒性に伴うストレスを反映した変化と考えられる。

以上の変化を用量との関係でみると，1 mg/kg 群ではこのような変化は認められなかった。5 mg/kg 群においても，雌で腎臓がやや大きく肉眼的に腫大と記録した１匹があったが，病理組織学的には異常は認められず，その他の変化も特に認められなかった。25 mg/kg 群では，肝臓及び腎臓の形態的変化並びに血液生化学的変化が発現し，雄は体重増加の抑制傾向

を示し，明らかな毒性影響が認められた。100 mg/kg 群では，25 mg/kg 群でみられた変化がより明らかとなり，さらに貧血所見が加わり，一般状態に著変はなかったものの，投与開始後一過性の摂餌量の減少が雌雄に認められ，雄では投与後半において体重増加は有意に抑制された。

一方，生殖発生毒性に関しては，観測した各指標とも，対照群と被験物質投与各群との間に有意な差はなく，ＤＣＮＢの生殖及び発生に対する影響は認められなかった。

本被験物質の類縁化合物であるニトロベンゼンには精巣毒性が知られている[1) 2)]。25及び 100 mg/kg 群の精巣及び 100 mg/kg 群の精巣上体に，いずれも相対重量のみの増加が認められた。しかし，これらの臓器には病理組織学的な異常は認められず，生殖能の異常も認められなかったことから，雄性生殖器に対する毒性を示唆するものでなく，体重増加抑制に伴う見掛け上の変化であると判断される。交尾が確認されたにもかかわらず妊娠しなかったつがいが投与量とは無関係に各群に散発したが，病理学的にはこれらの個体に生殖能の異常を示唆する変化は認められなかった。また，出産児の性比は群間でバラツキがみられたが，一定の変化傾向を示すものではなく，これらはいずれも偶発的な変化と判断された。

以上の結果から，ＤＣＮＢ投与により生殖や発生に対する明らかな影響は認められなかったものの，肝臓及び腎臓に対する毒性影響や溶血性貧血が発現することが明らかとなった。また，無影響量は，5 mg/kg/日であると推定された。

文献

1) T.E.Cody, S.Witherup, L.Hastings, K.Stemmer and R.T.Christian (1981): 1,3-Dinitrobenzene: Toxic effects in vivo and in vitro. *J.Toxicol. Environ. Health*, 7, 829-847

2) R.O.Beauchamp,Jr., R.D.Irons, D.E.Rickert, D.B.Couch and T.E.Hamm,Jr. (1983): A critical review of the literature on nitrobenzene toxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 2, 33-84

1,2－ジクロロ－3－ニトロベンゼンの
ラットを用いた経口投与による反復投与
毒性・生殖発生毒性併合試験
（試験番号　91－024）

最 終 報 告 書　添付資料A（図・表・写真）

平成　4年　8月25日

財団法人　畜産生物科学安全研究所

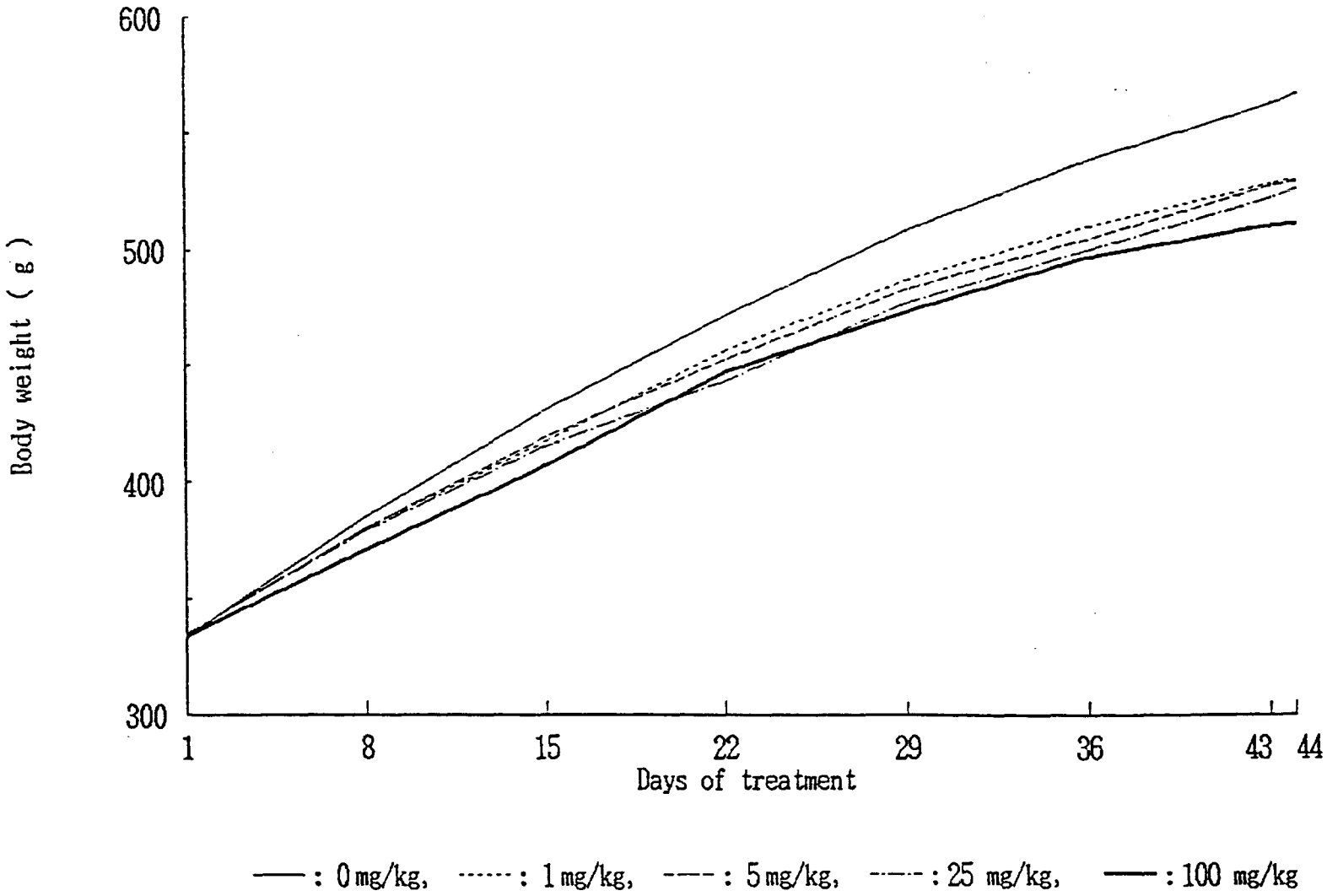

Fig. 1 Body weight change in parental males

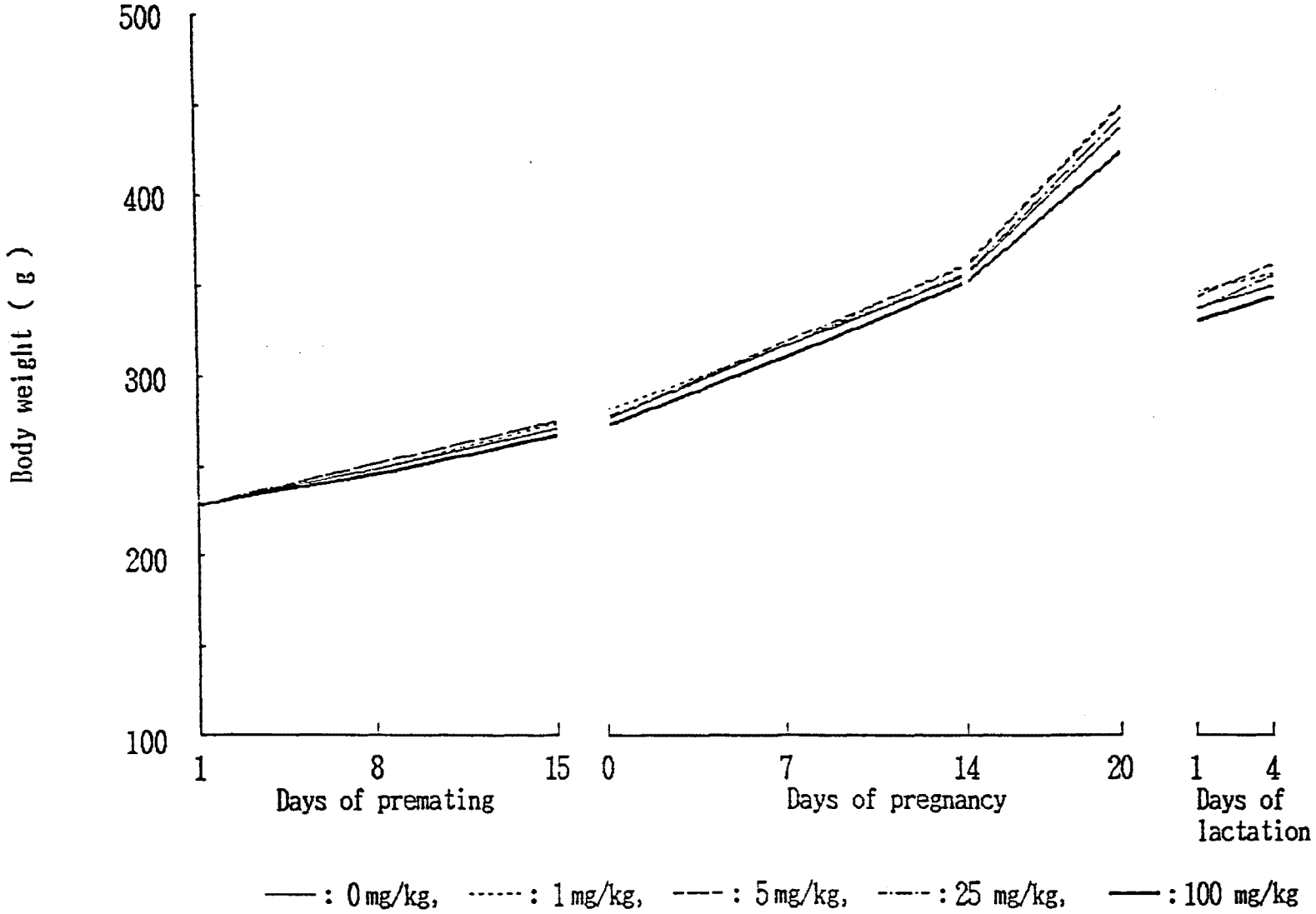

Fig.2 Body weight change in parental females

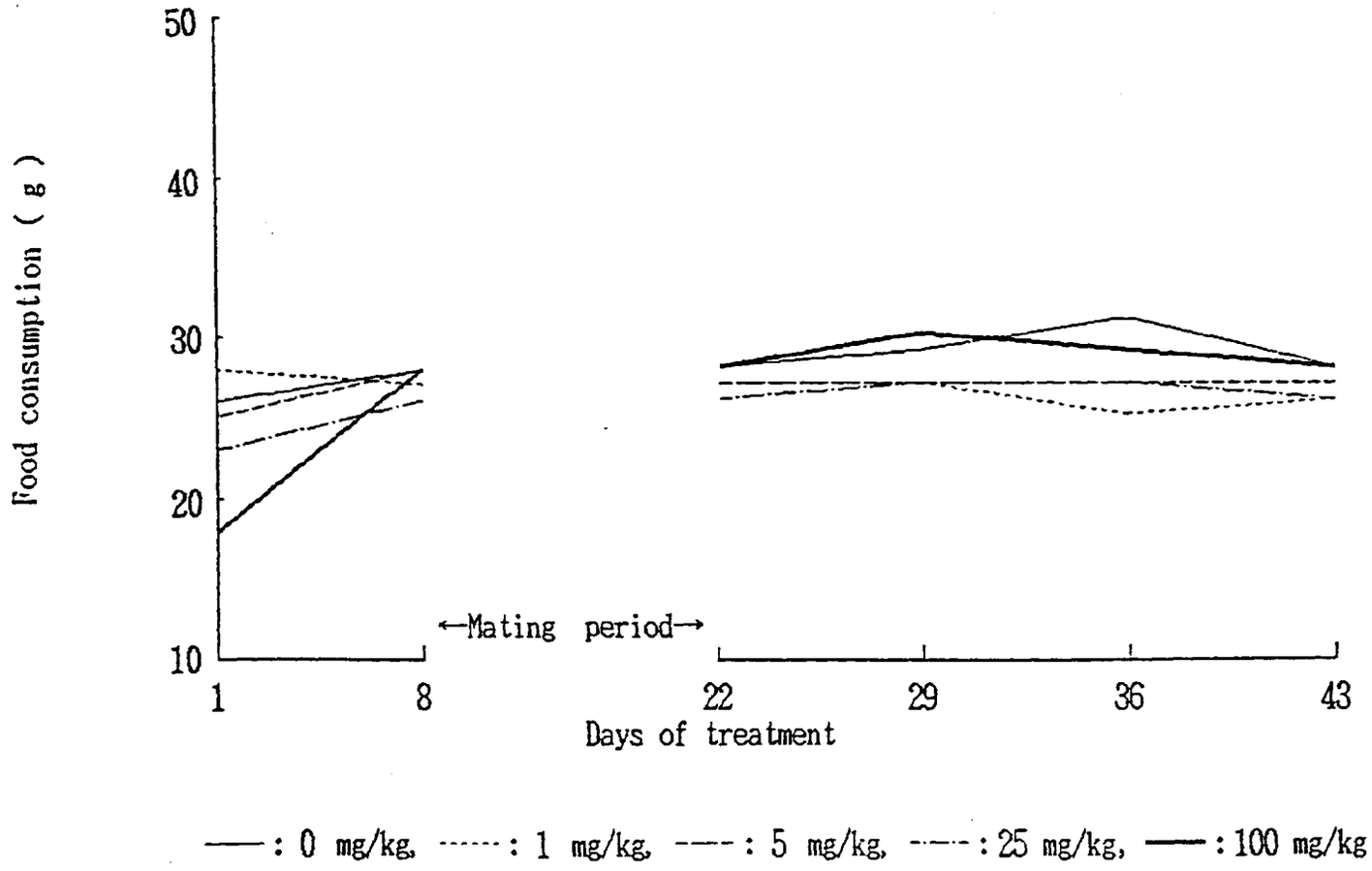

Fig. 3 Food consumption change in parental males

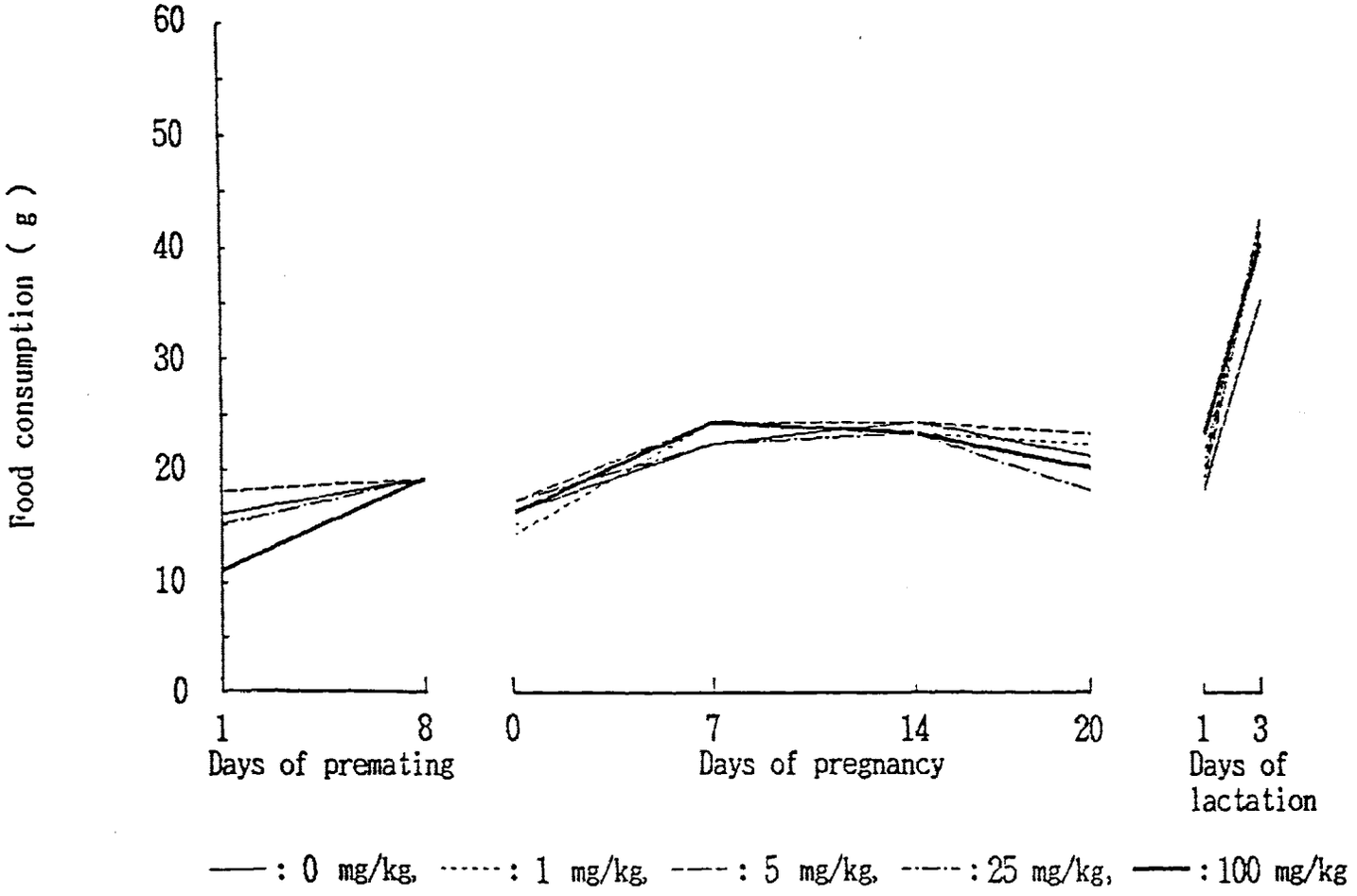

Fig. 4 Food consumption change in parental females

Table 1 Clinical signs — Summarized data in parental males

Clinical signs	Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
	Animals examined	10	10	10	10	10
No abnormalities detected		9	10	10	9	10
Incisores abnormalitiy		1	0	0	0	0
Blotted left eyelid		0	0	0	1	0

Table 2 Clinical signs — Summarized data in parental females

Clinical signs	Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
	Animals examined	10	10	10	10	10
No abnormalities detected		10	10	10	10	10

Table 3 Body weights — Group mean values in parental males

(g)

Dose (mg/kg)	Animals examined	Day 1	8	15	22	29	36	43	44
0	10	334 7 (9) [a]	385 12 (9)	431 20 (9)	471 25 (9)	508 32 (9)	539 38 (9)	563 42 (9)	568 43 (9)
1	10	335 7 (10)	380 10 (10)	417 15 (10)	456 20 (10)	487 21 (10)	510 19 (10)	529 16 (10)	531 15 (10)
5	10	335 7 (10)	380 11 (10)	419 14 (10)	452 18 (10)	483 20 (10)	505 25 (10)	528 26 (10)	530 26 (10)
25	10	335 7 (10)	379 11 (10)	415 16 (10)	443 18 (10)	477 23 (10)	500 26 (10)	523 28 (10)	527 30 (10)
100	10	334 7 (10)	371 12 (10)	407 15 (10)	447 19 (10)	473 23 (10)	497 * 29 (10)	511 * 36 (10)	512 * 35 (10)

Each value is expressed as mean, S.D. and (available animals)
a : Animal number 003 had an incisores abnormality, data not included in statistics
* : Significantly different from control at 5 % level of probability

Table 4 Body weight — Group mean values in parental females

(g)

Dose (mg/kg)	Animals examined	Days of premating			Days of pregnancy				Days of lactation	
		1	8	15	0	7	14	20	1	4
0	10	228	248	270	275	315	354	435	336	348
		7	13	17	14	21	27	26	30	30
		(10)	(10)	(10)	(8)[a]	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)
1	10	228	248	273	280	315	360	448	345	355
		7	9	13	17	19	23	20	36	31
		(10)	(10)	(10)	(7)[a]	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)
5	10	227	251	274	275	318	359	447	342	360
		6	10	14	14	17	20	25	26	21
		(10)	(10)	(10)	(9)[a]	(9)	(9)	(9)	(9)	(9)
25	10	228	251	274	276	315	355	441	335	354
		7	9	9	13	11	14	16	22	12
		(10)	(10)	(10)	(8)[a]	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)
100	10	228	245	266	271	309	350	422	329	342
		7	10	9	13	17	20	38	21	20
		(10)	(10)	(10)	(8)[a]	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)

Each value is expressed as mean, S.D. and (available animals)
a : Total pregnant

Table 5 Food consumption — Group mean values in parental males

(g/day)

Dose (mg/kg)	Animals examined	Day 1	8	22	29	36	43
0	10	26 2 (9) [a]	29 3 (9)	28 3 (9)	29 4 (9)	31 3 (9)	28 3 (9)
1	10	28 3 (10)	27 3 (10)	27 2 (10)	27 2 (10)	25 * 4 (10)	26 3 (10)
5	10	25 3 (10)	28 2 (10)	27 1 (10)	27 2 (10)	27 3 (10)	27 2 (10)
25	10	23 2 (10)	26 2 (10)	26 3 (10)	27 2 (10)	27 3 (10)	26 3 (10)
100	10	18 ** 2 (10)	28 4 (10)	28 3 (10)	30 3 (10)	29 4 (10)	28 4 (10)

Each value is expressed as mean, S.D. and (available animals)
a : Animal number 003 had an incisores abnormality, data not included in statistics
* : Significantly different from control at 5 % level of probability
**: Significantly different from control at 1 % level of probability

Table 6 Food consumption — Group mean values in parental females

(g/day)

Dose (mg/kg)	Animals examined	Days of premating		Days of pregnancy				Days of lactation	
		1	8	0	7	14	20	1	3
0	10	16 3 (10)	19 3 (10)	16 4 (8)[a]	22 4 (8)	24 4 (8)	21 4 (8)	18 6 (8)	35 6 (8)
1	10	16 2 (10)	19 4 (10)	15 3 (7)[a]	23 2 (7)	24 3 (7)	24 3 (7)	21 6 (7)	41 7 (7)
5	10	18 3 (10)	19 3 (10)	17 3 (9)[a]	24 4 (9)	24 4 (9)	23 2 (9)	19 5 (9)	41 5 (9)
25	10	15 2 (10)	19 2 (10)	16 3 (8)[a]	22 3 (8)	23 3 (8)	18 3 (8)	20 7 (8)	42 5 (8)
100	10	11** 3 (10)	19 2 (10)	16 3 (8)[a]	24 3 (8)	23 4 (8)	20 5 (8)	23 5 (8)	40 9 (8)

Each value is expressed as mean, S.D. and (available animals)
a : Total pregnant
**: Significantly different from control at 1 % level of probability

Table 7 − 1 Urinary findings - Summarized data in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	pH							Protein						Glucose				
		5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	−	±	+	++	+++	++++	−	±	+	++	+++
0	10			5	3	2				2	5	3			10				
1	10			5	2	3					9	1			10				
5	10			5	3	1	1			1	7	2			10				
25	10			2	7	1				2	5	3			10				
100	10		2	8								10**			10				

Protein : −(negligible), ±(15~30mg/dl), +(30mg/dl), ++(100mg/dl), +++(300mg/dl), ++++(1000mg/dl)
Glucose : −(negligible), ±(0.1g/dl), +(0.25g/dl), ++(0.5g/dl), +++(1g/dl)
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 7 − 2 Urinary findings - Summarized data in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	Ketone body					Occult blood					Urobilinogen					Bilirubin			
		−	±	+	++	+++	−	±	+	++	+++	0.1	1	2	4	8	−	+	++	+++
0	10	5	5				6	4				10					10			
1	10	3	7				9	1				10					10			
5	10	6	3	1			7	3				10					10			
25	10	6	4				5	4	1			10					10			
100	10	7	3				3	7				10					10			

Ketone body : −(negligible), ±(5mg/dl), +(15mg/dl), ++(40mg/dl), +++(80mg/dl)
Occult blood :−(negligible), ±(trace), +(slight), ++(moderate), +++(marked)
Urobilinogen : Ehrlich unit/dl
Bilirubin : −(negligible), +(slight), ++(moderate), +++(marked)

Table 8 Hematological findings - Summarized data in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	RBC ($10^4/\mu l$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (‰)	WBC ($10^2/\mu l$)	Plat. ($10^4/\mu l$)
0	10	832	15.1	44.1	53	18.2	34.3	37	89	145
		25	0.4	1.2	1	0.5	0.4	5	29	12
1	10	855	15.6	45.2	53	18.2	34.4	39	79	136
		48	0.6	1.5	2	0.6	0.4	5	15	17
5	10	855	15.4	44.8	53	18.0	34.3	41	81	148
		42	0.5	1.3	2	0.6	0.2	5	16	13
25	10	834	15.0	43.5	52	18.0	34.6	42	80	143
		20	0.3	0.6	1	0.6	0.7	7	14	19
100	10	807	14.2**	42.0**	52	17.6	33.9	49**	94	141
		28	0.2	0.9	2	0.6	0.6	5	25	18

Each value is expressed as mean and S.D.
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 9 - 1 Biochemical findings - Summarized data in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	γ-GTP (IU/l)	T.P. (g/dl)	Alb. (g/dl)	A/G	T-Cho. (mg/dl)	T.G. (mg/dl)
0	10	52	25	248	0.19	6.74	2.98	0.79	84	100
		8	3	57	0.11	0.28	0.15	0.06	25	66
1	10	49	25	236	0.27	6.76	3.03	0.81	74	80
		5	4	48	0.20	0.24	0.10	0.04	10	30
5	10	52	23	245	0.36	6.80	3.01	0.80	82	87
		8	4	52	0.19	0.24	0.15	0.08	14	37
25	10	46	22	203	0.29	7.19**	3.30**	0.85	114**	115
		6	7	39	0.20	0.23	0.14	0.07	15	54
100	10	57	30	220	0.42	7.08*	3.17*	0.81	123**	108
		6	8	59	0.14	0.23	0.16	0.06	22	44

Each value is expressed as mean and S.D.
* : Significantly different from control at 5% level of probability
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 9 - 2 Biochemical findings - Summarized data in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	Glu. (mg/dl)	T-Bil. (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Crea. (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
0	10	164	0.35	13.9	0.51	10.4	6.7	141.6	4.27	101.0
		20	0.03	1.0	0.04	0.3	0.5	0.7	0.22	1.1
1	10	163	0.39	13.0	0.52	10.3	7.0	141.6	4.26	101.4
		19	0.05	1.2	0.05	0.2	0.6	1.2	0.20	1.1
5	10	154	0.39	13.4	0.47	10.3	6.7	141.6	4.25	101.1
		16	0.03	1.6	0.05	0.2	0.3	0.5	0.14	1.1
25	10	155	0.38	13.0	0.48	10.7	6.9	142.2*	4.30	100.5
		12	0.05	0.8	0.04	0.2	0.4	1.1	0.23	1.4
100	10	154	0.37	11.9**	0.49	10.6	6.9	142.1*	4.13	100.1
		8	0.06	1.0	0.05	0.2	0.6	1.4	0.26	0.9

Each value is expressed as mean and S.D.
* : Significantly different from control at 5% level of probability
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 10 Necropsy findings — Summarized data in parental males

Organ : Findings	Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
	Animals examined	10	10	10	10	10
Liver : Enlargement	+	0	0	0	5**	8**
Kidney : Enlargement	+	0	0	0	1	2
	++	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	1	3
Blackish brown in color	+	0	0	0	0	9**

+ : Slight, ++ : Moderate
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 11 Necropsy findings — Summarized data in parental females

Organ : Findings	Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
	Animals examined	10	10	10	10	10
Liver : Enlargement	+	0	0	0	5	4
	++	0	0	0	0	6
	Total	0	0	0	5**	10**
Kidney : Enlargement	+	0	0	1	2	4
Blackish brown in color	+	0	0	0	1	9
	++	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	1	10**
Thymus : Atrophy	+	1	1	1	1	6*
Ovary : Cystic ovarian bursa	+	0	0	0	1	0
Adrenal: Reddish color	+	0	1	0	0	0

+ : Slight, ++ : Moderate
* : Significantly different from control at 5% level of probability
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 12 Absolute organ weights - Summarized data in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	B.W. (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Thymus (g)	Testis (g)	Epidid. (g)
0	10	535	17.76	3.54	0.41	3.28	1.33
		43	2.88	0.34	0.11	0.23	0.09
1	10	506	16.23	3.35	0.44	3.30	1.35
		15	1.34	0.22	0.07	0.17	0.07
5	10	505	17.00	3.49	0.37	3.40	1.35
		24	2.02	0.26	0.07	0.24	0.07
25	10	496*	19.71	3.75	0.38	3.47	1.35
		28	2.35	0.42	0.06	0.29	0.11
100	10	481**	21.64**	4.11**	0.38	3.39	1.37
		31	2.27	0.51	0.10	0.32	0.12

Each value is expressed as mean and S.D.
* : Significantly different from control at 5% level of probability
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 13 Absolute organ weights - Summarized data in parental females

Dose (mg/kg)	Animals examined	Animals @ available	B.W. (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Thymus (g)
0	10	8	348	13.86	2.00	0.24
			30	0.80	0.11	0.12
1	10	7	355	15.00	2.20	0.20
			31	1.11	0.21	0.07
5	10	9	360	15.30	2.19	0.28
			21	0.62	0.22	0.09
25	10	8	354	17.27*	2.30	0.20
			12	0.65	0.25	0.04
100	10	8	342	20.52**	2.46**	0.15
			20	2.24	0.19	0.05

Each value is expressed as mean and S.D.

@ : Statistical analyses were made from the data of females becoming pregnant

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 14 Relative organ weights - Summarized data in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	B.W. (g)	Liver (%)	Kidney (%)	Thymus (%)	Testis (%)	Epidid. (%)
0	10	535	3.30	0.66	0.08	0.62	0.25
		43	0.30	0.07	0.02	0.07	0.03
1	10	506	3.21	0.66	0.09	0.65	0.27
		15	0.23	0.05	0.01	0.03	0.01
5	10	505	3.36	0.69	0.07	0.68	0.27
		24	0.27	0.07	0.01	0.06	0.02
25	10	496*	3.96**	0.76*	0.08	0.70*	0.27
		28	0.29	0.08	0.01	0.08	0.03
100	10	481**	4.49**	0.85**	0.08	0.70**	0.29**
		31	0.26	0.10	0.02	0.05	0.03

Each value is expressed as mean and S.D.
* : Significantly different from control at 5% level of probability
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 15 Relative organ weights - Summarized data in parental females

Dose (mg/kg)	Animals examined	Animals @ available	B.W. (g)	Liver (%)	Kidney (%)	Thymus (%)
0	10	8	348	4.00	0.58	0.07
			30	0.22	0.03	0.03
1	10	7	355	4.23	0.62	0.06
			31	0.31	0.04	0.02
5	10	9	360	4.26	0.61	0.08
			21	0.18	0.06	0.02
25	10	8	354	4.89*	0.65	0.06
			12	0.10	0.06	0.01
100	10	8	342	5.99**	0.72**	0.04
			20	0.42	0.06	0.02

Each value is expressed as mean and S.D.
@ : Statistical analyses were made from the data of females becoming pregnant
* : Significantly different from control at 5% level of probability
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 16 - 1 Histopathological findings -- Summarized data in parental males

Organ	: Findings	Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
		Animals examined	10	10	10	10	10
Liver	: Hepatocellular swelling	+	0	0	0	7	7
		++	0	0	0	0	3
		Total	0	0	0	7 **	10**
	Hepatocellular fatty change	+	3	1	0	0	0
Kidney	: Hyaline droplets in proximal tubular epithelium	+	0	0	0	4	0
		++	0	0	0	3	9
		+++	0	0	0	0	1
		Total	0	0	0	7**	10**
	Eosinophilic bodies in proximal tubule	+	3	3	2	2	4
		++	2	1	1	4	1
		+++	0	0	0	0	1
		Total	5	4	3	6	6
	Tubular dilatation with hyaline casts	+	1	0	1	0	2
	Tubular casts	+	0	0	0	0	2
	Tubular atrophy and regeneration	+	2	0	0	4	4
		++	0	0	0	0	3
		+++	0	0	0	0	1
		Total	2	0	0	4	8**

+ : Slight, ++ : Moderate, +++ : Marked
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 16 - 2 Histopathological findings — Summarized data in parental males

Organ	: Findings	Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
		Animals examined	10	10	10	10	10
Spleen	: Increased extramedullary hematopoiesis	+	0	0	0	0	2
	Hemosiderosis	+	0	0	0	4*	8**
Heart	: Myocardial fibrosis	+	2	1/3[a]	0/1[a]	0/2[a]	1
		++	1	0/3[a]	1/1[a]	1/2[a]	1
		Total	3	1/3	1/1	1/2	2
Adrenal	: Focal hypertrophy of zona glomerulosa	++	0	0/3[a]	0/1[a]	0/2[a]	1

a : Examinations limited to the males failed to cause the pregnancy (No. of abnormal animals / No. of animals examined)
+ : Slight, ++ : Moderate
* : Significantly different from control at 5% level of probability
** : Significantly different from control at 1% level of probability
No abnormalities detected in bone marrow, brain, testis, and thymus from males caused pregnancy of control and 100 mg/kg groups, and in epididymis, seminal vesicle, prostate and pituitary in addition to those organs mentioned above from males failed to cause pregnancy of control and all dose groups.

Table 17 - 1 Histopathological findings — Summarized data in parental females

Organ	: Findings	Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
		Animals examined	10	10	10	10	10
Liver	: Hepatocellular swelling	+	0	0	0	10	0
		++	0	0	0	0	10
		Total	0	0	0	10**	10**
	Focal necrosis	+	0	0	0	0	1
Kidney	: Tubular dilatation with or without hyaline casts	+	0	0	1	0	1
	Tubular epithelial vacuolation	+	0	0	0	1	3
		++	0	0	0	1	3
		+++	0	0	0	0	1
		Total	0	0	0	2	7**
	Tubular atrophy and regeneration	+	0	0	1	0	1
	Fibrotic foci	+	0	1	0	0	0
	Tubular mineralization	+	1	0	0	0	0

+ : Slight, ++ : Moderate, +++ : Marked
** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 17 - 2 Histopathological findings — Summarized data in parental females

Organ	: Findings	Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
		Animals examined	10	10	10	10	10
Spleen	: Hemosiderosis	+	0	0	0	1	5**
Thymus	: Atrophy	+	1	0	0	0	4
Ovary	: Cystic follicles	+	0	0/3[a]	0/1[a]	1/2[a]	0

a : Examinations limited to the females failed to carry the pregnancy (No. of abnormal animals / No. of animals examined)
+ : Slight
** : Significantly different from control at 1% level of probability
No abnormalities detected in heart, bone marrow, brain, ovary and adrenal from females becoming pregnant of control and 100 mg/kg groups, and in uterus, vagina and pituitary in addition to those organs mentioned above from females failed to carry the pregnancy of control and all dose groups.

Table 18 Reproduction results — Summarized data

Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
No. of pairs mated	10	10	10	10	10
No. of pairs with successful copulation	10	10	10	10	10
Copulation index (%)	100	100	100	100	100
No. of pregnant females	8	7	9	8	8
Fertility index (%)	80	70	90	80	80
No. of corpora lutea (Mean±S.D.)	19.8±3.9	19.7±2.7	18.4±1.9	20.4±3.7	19.6±3.8
No. of implantation sites (Mean±S.D.)	15.9±4.5	16.6±4.5	16.2±2.8	18.0±2.1	15.6±4.5
Implantation index (%, Mean±S.D.)	81.3±23.2	83.6±19.4	88.1±14.0	89.4±8.7	79.1±20.3
No. of pregnant females with live pups	8	7	9	8	8
Gestation index (%)	100	100	100	100	100
Gestation length (days, Mean±S.D.)	21.5±0.5	21.6±0.5	21.4±0.5	21.5±0.5	21.4±0.5
No. of pregnant females survived	8	7	9	8	8
Survival index (%)	100	100	100	100	100

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100
Fertility index = (No. of pregnant animals/No. of pairs with successful copulation)×100
Gestation index = (No. of females with live pups/No. of pregnant females)×100
Survival index = (No. of pregnant females survived/No. of pregnant females)×100

Table 1 9 Litter results — Summarized data

Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
No. of pups born[a]	15.1±4.1	15.6±4.6	15.3±2.5	16.4±2.1	14.6±4.5
Delivery index (%)	95.8±4.1	93.2±5.4	94.8±3.3	91.0±5.6	92.4±7.4
No. of pups alive on day 1 of lactation					
Total	14.8±4.0	15.3±4.4	15.2±2.4	15.9±2.0	13.9±4.4
Male	8.0±3.0	7.7±2.9	7.0±1.1	9.4±2.4	6.0±2.4
Female	6.8±2.8	7.6±2.7	8.2±2.3	6.5±2.9	7.9±3.8
Live birth index (%)	97.7±3.2	98.6±3.8	99.4±1.9	97.0±3.3	95.6±9.8
Sex ratio (Female/Male)	0.86	0.98	1.16	0.69	1.34
No.of pups alive on day 4 of lactation					
Total	14.8±4.0	15.0±4.4	14.9±2.3	15.5±1.8	13.8±4.3
Male	8.0±3.0	7.7±2.9	6.9±1.3	9.3±2.5	5.9±2.2
Female	6.8±2.8	7.3±2.7	8.0±2.2	6.3±2.6	7.9±3.8
Viability index (%)	100 ± 0	98.2±3.1	97.9±3.2	97.9±4.3	99.3±2.1
Body weight of live pups (g)					
On day 1					
Male	7.0±1.0	7.1±0.8	7.0±0.4	6.9±0.6	6.8±0.6
Female	6.7±0.8	6.5±0.6	6.6±0.5	6.6±0.7	6.6±0.8
On day 4					
Male	10.4±2.0	10.9±1.9	10.3±1.1	10.2±1.2	10.1±1.4
Female	10.0±1.9	10.0±1.5	9.9±1.2	9.5±1.1	9.8±1.6

a : Examined on day 1 of lactation
Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100
Live birth index = (No. of live pups on day 1/No. of pups born)×100
Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 1) ×100
Sex ratio = Total No. of female pups/Total no. of male pups
Each value is expressed as Mean ± S.D., except for sex ratio

Table 20 External and visceral findings — Summarized data in pups

Findings	Dose (mg/kg)	0	1	5	25	100
External	No. of pups examined	121	109	138	130	117
	No. of pups with external anomalies	0 (0)[a]	1 (0.8±2.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	External anomalies					
	Absence of tail	0 (0)[a]	1 (0.8±2.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Imperforate anus	0 (0)[a]	1 (0.8±2.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Visceral	No. of pups examined	121	108	136	128	116
	No. of pups with visceral anomalies	0 (0)[a]	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	No. of pups with visceral variations	7 (5.0±8.0)[a]	8 (8.6±11.8)	10 (7.4±7.9)	11 (8.5±9.9)	6 (5.1±7.3)
	Visceral variations					
	Thymic remnant in neck	5 (3.6±8.3)[a]	8 (8.6±11.8)	9 (6.7±8.3)	10 (7.7±7.8)	6 (5.1±7.3)
	Persistent left umbilical artery	2 (1.4±2.6)[a]	0 (0)	1 (0.7±2.1)	1 (0.8±2.2)	0 (0)

a : Mean ± S.D. of individual litter percentages