最 終 報 告 書

N－（1,3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1,4－ベンゼンジアミンの
ラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

試験番号：4210（ 115 － 128 ）

平成 12 年 9 月 26 日

試験委託者
厚生省　生活衛生局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目　次

1. 要約 4
2. 諸言 5
3. 表題 6
4. 試験目的 6

10. 試験材料および方法 7
11. 試験結果 13
12. 考察および結論 16
13. 参考文献 18

Figures F-1~4
Figure 1 Body weight change of male rats F-1
Figure 2 Body weight change of female rats F-2
Figure 3 Food consumption of male rats F-3
Figure 4 Food consumption of female rats F-4

Tables T-01~27
Table 1-1 Clinical observations in male rats T-01
Table 1-2 Clinical observations in female rats (Before and during mating period) T-02
Table 1-3 Clinical observations in female rats (Gestation period) T-03
Table 1-4 Clinical observations in female rats (Lactation period) T-05
Table 2-1 Body weight change of male rats T-06
Table 2-2 Body weight change of female rats T-07
Table 3-1 Food consumption of male rats T-08
Table 3-2 Food consumption of female rats T-09
Table 4-1 Absolute and relative organ weight of male rats T-10
Table 4-2 Absolute and relative organ weight of female rats T-11
Table 5-1 Summary of gross findings (dead, female) T-12
Table 5-2 Summary of gross findings (sacrificed and non-pregnancy, male) T-13

Table 5-3	Summary of gross findings (sacrificed, female)	T-14
Table 6-1	Summary of histological findings (dead, female)	T-15
Table 6-2-1	Summary of histological findings (sacrificed, male)	T-16
Table 6-2-2	Summary of histological findings (sacrificed, male)	T-17
Table 6-3-1	Summary of histological findings (sacrificed, female)	T-18
Table 6-3-2	Summary of histological findings (sacrificed, female)	T-19
Table 6-4	Summary of histological findings (non-pregnancy, male)	T-20
Table 6-5	Summary of histological findings (non-pregnancy, female)	T-21
Table 7	Copulation and fertility results in rats	T-22
Table 8	Findings of delivery in dams (F0)	T-23
Table 9	External observations on live pups (F1) from rats	T-24
Table 10	Body weight change of pups (F1) from rats	T-25
Table 11-1	Summary of gross findings of pups (F1) from rats (sacrificed, male)	T-26
Table 11-2	Summary of gross findings of pups (F1) from rats (sacrificed, female)	T-27

1. 要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため，N－（1，3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1，4－ベンゼンジアミンの 0（溶媒対照群），6，25 および 100 mg/kg/day を雌雄ラットの交配前 14 日から交配期間を通じ，さらに雄では交配期間終了後 20 日間，雌では妊娠期間および哺育 3 日まで連続経口投与し，生殖・発生に及ぼす影響を検討した．

1）親動物（F0）に及ぼす影響
100 mg/kg 群の雌で死亡が 1 例認められた．
被験物質投与による投与後症状として，流涎が雄の 25 および 100 mg/kg 群，雌の 100 mg/kg 群で観察された．
体重および摂餌量には，被験物質投与の影響は認められなかった．
病理学的検査では，雌雄ともに 25 および 100 mg/kg 群で肝重量の増加が観察され，剖検所見では雌雄の 100 mg/kg 群で肝臓の肥大が，組織所見では雄の 25 および 100 mg/kg 群で微小な空胞変性が認められた．生殖器系には，被験物質投与に起因すると考えられる所見は雌雄ともに観察されなかった．

2）生殖能に及ぼす影響
交尾能，受胎能および性周期に被験物質投与の影響は認められなかった．また，分娩状態にも異常は観察されなかった．

3）新生児に及ぼす影響
新生児の外表検査では，異常は認められず，生存性および体重変化にも被験物質投与の影響は認められなかった．哺育期間中の死亡児および哺育 4 日の出生児の剖検では，被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった．

以上の結果から，本試験条件下におけるN－（1，3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1，4－ベンゼンジアミンの親動物に対する無影響量は雌雄ともに 6 mg/kg/day と判断された．生殖能および次世代児に対する影響はともに 100 mg/kg/day 投与によっても認められず，無影響量は 100 mg/kg/day と判断された．

2. 緒言

N－（1, 3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1, 4－ベンゼンジアミン（N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-1,4-benzenediamine）は，脱酸素剤やゴムの老化防止剤として使用されている化合物である．本化合物の急性あるいは亜急性毒性に関する情報は若干あるものの[1]，生殖毒性に関する報告はない．今回，OECD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として，N－（1, 3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1, 4－ベンゼンジアミンの親ラットの生殖能力および次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討したのでその結果を報告する．

3. 表題

N－（1, 3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1, 4－ベンゼンジアミンのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

4. 試験目的

既存化学物質の毒性学的性質を評価する一環として行うOECDガイドライン「簡易生殖毒性試験」（1995年7月）に従い，ラットを用いて生殖・発生に及ぼす影響を検討した．

試験の実施は環企研第233号，衛生第38号，63基局第823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」の基準を満たすものとした．

10. 試験材料および方法

10.1 被験物質

N－（1,3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1,4－ベンゼンジアミン（N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-1,4-benzenediamine，別名 N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine，CAS No. 793-24-8，　　製造，Lot No.　　純度 99.4 wt %，分子量 268.40，融点 49 ℃，沸点 380 ℃）は暗紫褐色の粒状個体であり，使用時まで直射日光を避け，被験物質冷蔵庫に保管した．N－（1, 3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1, 4－ベンゼンジアミンを実測した結果は，Reference data 1 に示した．

被験物質は，瑪瑙乳鉢で粉砕後，コーンオイル（ナカライテスク株式会社，Lot. V8P6862，V8P7097，V9B8669）に溶解し，1.2，5 および 20 mg/mL の濃度になるよう各群の投与液を調製した．投与液は，1 日使用分ずつ褐色瓶に分注して投与時まで冷暗所（冷蔵庫）で保存し，調製後 7 日以内に使用した．投与液中の被験物質は 1.2 および 80 mg/mL について，調製後室温保存で 8 日間まで安定であることを予備試験において確認した．

投与液の濃度分析は，調製開始時に調製したすべての試験群の投与液について行った．その結果，Reference data 2 に示すように表示濃度に対し 90.8 ～ 103.0 %の範囲であった．したがって，投与液にはほぼ所定量のN－（1, 3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1,4－ベンゼンジアミンが含有されていることを確認した．

投与終了後に製造元に返却した被験物質について，製造元で再分析した結果，純度は 99.4 %であり，被験物質は投与期間中安定であったことが確認された（Reference data 3）．

10.2 使用動物および飼育条件

試験には，日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県横浜市）から購入した生後 8 週齢の Sprague-Dawley（Crj：CD (SD)，SPF）系雌雄ラットを使用した．購入した動物は 7 日間検疫・馴化飼育した後，一般状態に異常が認められなかったものを 10 週齢で群分けして試験に用いた．群分け終了時の体重は，雄で 354 ～ 397 g，雌で 217 ～ 244 g の範囲であった．

動物は，温度 24 ± 3 ℃，湿度 55 ± 20 %，換気回数 15 回／時間，照度 150 ～ 300 lux，照明時間 12 時間（午前 7 時点灯，午後 7 時消灯）に調節されたバリアシステムの飼育室（W 5.7 × D 8.0 × H 2.5 m，114.0 m^3）で飼育した．動物の検疫・馴化期間も含め，飼育期間における温度および湿度の実測値は，それぞれ 21.7 ～ 25.6 ℃，36 ～ 64 %であり，目標範囲内であった．

株式会社 東京技研サービス（東京都府中市）の自動水洗式飼育機（W 691.0 × D 79.0 × H 195.0 cm）を使用し，アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W 15.8 × D 23.8 × H 16.0 cm，飼育ケージ・スペース 6017 cm^3）に動物を 1 匹ずつ収容し飼育した．但し，交配期間中は，雄をアルミ製前面，床ステンレス網目飼育ケージ（W 36.8 × D 25.0 × H 16.0 cm，飼育ケージ・スペース 14720 cm^3）に 1 匹ずつ収容し飼育した．妊娠 18 日以降の母動物は哺育 4 日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W 36.8 × D 25.0 × H 16.0 cm）に哺育トレーおよび巣作り材料（Care FRESH™，Absorption corporation 製造）を入れて飼育した．

飼育ケージは隔週1回，給餌器は週1回交換した．
飼料は，オリエンタル酵母工業株式会社（東京都中央区）製造の NMF 固型飼料（放射線滅菌飼料，ロット番号 981007，981202，990107）を使用し，飼育期間中自由に摂取させた．飲水は，水道水を自動給水ノズルより自由に摂取させた．供給した飼料および水には Reference data 4 および 5 に示した如く，試験に支障を来す可能性の考えられる夾雑物の混在はなかった．
なお，動物の馴化期間を含め，飼育期間中，データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった．

10.3 群分け・個体識別

動物はあらかじめ体重によって層別化し，無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けし，1 群当たり雌雄各 12 匹を用意した．なお，雌は群分け前に 8 日間の性周期観察を行い，正常な性周期を有する動物を群分けに用いた．
群分け後の動物の識別は，個体別に耳介に群番号および群内番号を入墨するとともにケージごとに動物標識番号（Animal ID-No.）をつけた．余剰動物は別途有効利用した．

10.4 投与量，群構成，投与期間および投与方法

同一被験物質のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験[1]（投与量：0，4，20 および 100 mg/kg）では，20 mg/kg 以上の投与群で投与直後に一過性の流涎が雌雄に，100 mg/kg 群で投与初期に摂餌量の減少が雌に認められた．また，100 mg/kg 群で肝臓重量の増加が雌雄に，20 mg/kg 群の雌および 100 mg/kg 群の雌雄に肝細胞の微細空胞化が認められた．さらに，主として 100 mg/kg 群で尿検査，血液学および血液生化学検査のいくつかの指標に被験物質投与の影響が認められた．
これらの結果をもとに，0，6，25，100 および 400 mg/kg の用量で予備試験「N－（1，3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1,4－ベンゼンジアミンのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験－2 週間投与予備試験（試験番号 4209）」を実施した．その結果，雄の 25 mg/kg 以上，雌の 100 mg/kg 以上の投与群で流涎が認められ，雄の 400 mg/kg 群で体重増加抑制，雌雄の 400 mg/kg 群で投与開始初期に摂餌量の減少が認められた．また，雌雄の 100 mg/kg 以上の投与群で肝臓の肥大が，雄の 400 mg/kg 群で肝臓の淡色化が認められ，雌雄の 100 mg/kg 以上の投与群で肝臓重量の高値，雌の 100 mg/kg 以上の投与群で副腎重量の高値が認められた．
以上のことから本試験では，投与期間が予備試験の 3 倍以上に延長されることを考慮して明らかな毒性兆候を示すことが予想される 100 mg/kg/day を高用量とし，以下公比約 4 で除し，25 および 6 mg/kg/day を設定した．
投与経路は，OECD ガイドライン「簡易生殖毒性試験」で指示されている投与経路に準じて強制経口投与とした．投与容量は，体重 100 g 当り 0.5 mL とし，交配前および交配期間中の雌雄および妊娠期間中の雌では，個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行った．また，哺育期間中の雌は，哺育 0 日に測定した個体別体重に基づいて算出を行った．胃ゾンデを用いて毎日 1 回（7 日／週）8:31 ～ 11:42 に強制経口投与した．対照群にはコーンオイルのみを同様に投与した．

雄の投与期間は，交配前 14 日間と交配期間 14 日間および交配期間終了後 20 日間の連続 48 日間とした．雌の投与期間は，交配前 14 日間と交配期間中（最長 14 日間）ならびに交尾成立雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育 3 日まで（41 ～ 54 日間）とした．なお，交尾成立後分娩しなかった雌は妊娠 25 日の解剖前日までの 39 ～ 41 日間とした．

10.5 観察，測定および検査

10.5.1 一般状態

雌雄とも，全例について試験期間中毎日観察した．

10.5.2 体　重

雄では，投与 1（投与開始日），8，15，22，29，36，43 および 49 日（剖検日）に測定し，投与 1 から 49 日までの体重増加量を算出した．

雌では，投与 1（投与開始日），8 および 15 日に測定し，投与 1 から 15 日までの体重増加量を算出した．また，交尾成立後の雌は，妊娠 0，7，14 および 21 日に，分娩した雌は哺育 0 および 4 日に測定し，それぞれ妊娠 0 から 21 日および哺育 0 から 4 日までの体重増加量を算出した．

10.5.3 摂 餌 量

雄では，投与 1（投与開始日），8，15，22，29，36，43 および 48 日（剖検前日）に餌重量を測定し，測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均 1 日摂餌量を算出するとともに，投与 1 から 15 日および投与 22 から 48 日までの累積摂餌量を算出した．

雌では，投与 1（投与開始日），8 および 15 日に測定し，測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均 1 日摂餌量を算出するとともに投与 1 から 15 日までの累積摂餌量を算出した．また，交尾成立の雌は妊娠 0，7，14 および 21 日に，分娩した雌は哺育 0 および 4 日に餌重量を測定し，測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均 1 日摂餌量を算出するとともに妊娠 0 から 21 日までの累積摂餌量を算出した．

なお，交配期間中の同居動物は摂餌量を測定しなかった．

10.5.4 交　配

交配前 14 日間の性周期観察を行った雌を同群内の雄のケージに入れ，1 対 1 で最長 14 日間毎晩同居させた．翌朝，膣垢中の精子確認をもって交尾成立とし，その日を妊娠 0 日とした．

性周期観察は交尾成立日まで行い，発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した．また，性周期観察期間中の異常性周期（4 または 5 日以外の性周期）発現率［（異常性周期を示す雌動物数／観察雌動物数）× 100］を算出した．

交配結果から，各群について交尾率［（交尾成立動物数／同居動物数）× 100］を算出した．

10.5.5 自然分娩時および出生児の観察

妊娠動物は全例を自然分娩させた．分娩の確認は妊娠 20 から 25 日午前 9 ～ 10 時に行い，この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物および分娩を開始した動物については分娩完了まで待ち，その日を哺育 0 日とした．午前 10 時を過ぎて分娩を開始した動物については，翌日を哺育 0 日とした．分娩を確認した全例について妊娠期間（哺育 0 日の年月日から妊娠 0 日の年月日を減じた日数），受胎率［（受胎動物数／交尾成立動物数）× 100］，出産率［（生児出産雌数／妊娠雌数）× 100］，着床率［（着床痕数／妊娠黄体数）× 100］，分娩率［（総出産児数／着床痕数）× 100］，出生率［（出産生児数／総出産児数）× 100］を算出した．

妊娠 25 日の午前 9 時までに分娩の認められなかった動物（動物番号 2102，2307）は，その日に病理解剖した．これらの動物は，Salewski 法により着床痕の有無を検査した．その結果，いずれも着床痕が認められなかったため，妊娠不成立と判定した．母動物は全例哺育 4 日に病理解剖した．

出産後，哺育 0 日に出産児数（生存児＋死亡児）を調べ，出生児は性別を判定するとともに外表異常の有無を調べた．また，哺育 0 および 4 日に雌雄個体別の体重を測定し，1 腹の雌雄別平均体重を算出した．

哺育期間中の死亡児はブアン氏液に固定し，器官・組織の肉眼的観察を行った．哺育 4 日に出生児全例をエーテル麻酔下で放血安楽死させ，器官・組織の肉眼的観察を行った．また，出生児の 4 日生存率［（哺育 4 日生児数／出産生児数）× 100］を算出した．

10.5.6 病理学的検査

10.5.6.1 剖検および器官重量

下記の①から④に該当する動物について病理解剖を実施し②および③については器官重量を測定した．

解剖では動物の外観，口腔，鼻孔および頭蓋腔，骨格，脳および脊髄の外観と切断面，胸腔，腹腔および骨盤腔とその内臓，頸部の組織および器官を検査した．

すべての肉眼的異常について，部位，大きさ，硬さなどを記録した．

①死亡動物

死亡動物は発見後直ちに解剖した．器官・組織の肉眼的観察を行った後，胸腺，肺，肝臓，副腎，卵巣，子宮および腟を 10 %中性緩衝ホルマリン液に固定した．

②雄動物

48 日間投与した翌日，エーテル麻酔下で放血安楽死させた．器官・組織の肉眼的観察を行った後，肝臓，副腎，精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比（相対重量：（器官重量／解剖日体重）× 100）を算出した．また，全動物の肝臓，副腎，精嚢，前立腺および一部の動物で変化が認められた器官・組織として肺および腎臓を 10 %中性緩衝ホルマリン液で固定した．なお，精巣および精巣上体はブアン氏液で 1 日固定した後，10 %中性緩衝ホルマリン液に固定した．

③自然分娩した雌

哺育4日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた．器官・組織の肉眼的観察を行った後，肝臓および副腎重量を測定し相対重量を算出した．また，重量測定器官に加え全動物の卵巣，子宮，膣および一部の動物で変化が認められた器官・組織として腎臓および皮膚を 10 %中性緩衝ホルマリン液で固定した．また，剖検時に黄体数および着床痕数を調べた．

④自然分娩の認められなかった雌

妊娠 25 日に，エーテル麻酔下で放血安楽死させた．器官・組織の肉眼的観察を行った後，肝臓，副腎，卵巣，子宮および膣を 10 %中性緩衝ホルマリン液で固定した．

10.5.6.2 病理組織学検査

下記に該当する動物の組織について株式会社 組織科学研究所（東京都青梅市）で常法に従ってパラフィン切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色した．鏡検は安評センターで実施し，病変の種類および程度について記録した．また，雄の肝臓に空胞変性が観察され，この空胞が脂質であるかどうかを証明するために雄の対照群および 100 mg/kg 群の代表例 1 例（動物番号 1001，1312）について安評センターで Oil 赤 O 染色ならびにナイル青染色を実施した．なお，100 mg/kg 群の雄の肝臓に被験物質投与の影響を示唆する変化が認められたため，低および中用量群の雄の肝臓についても検査を実施した．

①死亡動物

100 mg/kg 群の雌 1 例（動物番号 2303）の胸腺，肺，肝臓，副腎，卵巣，子宮および膣について実施した．

②妊娠を成立させた雄

対照群および 100 mg/kg 群のそれぞれ 12 および 11 例で肝臓，副腎，精巣および精巣上体について実施した．100 mg/kg 群の肝臓に被験物質投与の影響を示唆する変化が認められたため，6 および 25 mg/kg 群の全例（11 および 12 例）の肝臓についても検査を実施した．加えて，異常病変部組織として肺（動物番号 1309）および腎臓（動物番号 1106）についても検査を実施した．

③自然分娩した雌

対照群および 100 mg/kg 群のそれぞれ 12 および 10 例で肝臓，副腎および卵巣について実施した．これに加え，異常病変部組織として腎臓（動物番号 2010）および皮膚（動物番号 2306）についても検査を実施した．

④妊娠を成立させなかった雄および妊娠不成立の雌

6 および 100 mg/kg 群の各 1 組（動物番号 1102，1307，2102，2307）で肝臓，副腎，精巣，精巣上体，精嚢，前立腺，卵巣，子宮および膣について実施した．

10.6 統計解析

体重，摂餌量，黄体数，着床痕数，出産児数，死産児数，性比，平均性周期，妊娠期間，着床率，分娩率，出生率，外表異常発現率，出生児の 4 日生存率，器官重量および器官重量・体重比（相対重量）については多重比較検定[2)]を行った．まず Bartlett の等分散検定を実施し，等分散の場合は Dunnett の多重比較検定[3),4)]で対照群と各投与群間の有意差を検定した．Bartlett の等分散検定で不等分散の場合は Steel の検定を実施し，対照群と各投与群間の有意差を検定した．出産率，交尾率および受胎率については χ^2 検定[5),6)]を用いた．異常性周期発現率および病理学的検査の所見の発生率の検定は，Fisher の直接確率検定法[6)]を用いて検定した．病理組織学所見のうち被験物質投与群で程度の増強が認められた所見は－を「1」，+1 を「2」，+2 を「3」および+3 を「4」に割り当てて Mann-Whitney の U 検定[6)]を実施した．なお，哺育期間中の出生児に関する成績は 1 母体当りの平均を 1 標本とした．有意水準は 5 および 1 %の両側検定で実施した．

11. 試験結果

11.1 反復投与毒性

11.1.1 死亡および一般状態（Table 1-1 ～ 1-4, Appendix 1-1 ～ 1-4）

死亡例が，100 mg/kg 群の雌で妊娠 23 日の被験物質投与前に 1 例（動物番号 2303）認められた．主な一般状態の変化として，流涎が雄では 25 および 100 mg/kg 群，雌では 100 mg/kg 群で観察された．流涎は雄の 25 mg/kg 群では投与 2 週から投与終了まで 2 ～ 4 例に，100 mg/kg 群では投与 1 週は 1 例に，投与 2 週以降は 4 ～ 9 例に観察された．雌の 100 mg/kg 群では交配前・交配期間中は投与 2 週に 3 例，妊娠期間中は散発的に 1 ～ 5 例，分娩後哺育 3 日までは散発的に 1 ～ 3 例観察された．流涎は投与直後から認められ，おおむね投与後 30 分には消失した．その他，雌の 6 mg/kg 群で頸部の外傷および痂皮が同一個体の 1 例に，雌の 6 および 100 mg/kg 群で脱毛が各 1 例に観察された．

11.1.2 体　　重（Figure 1 ～ 2, Table 2-1 ～ 2-2, Appendix 2-1 ～ 2-2）

雌雄ともに投与期間を通じて対照群と被験物質投与群との間に統計学的に有意な差は認められなかった．

11.1.3 摂 餌 量（Figure 3 ～ 4, Table 3-1 ～ 3-2, Appendix 3-1 ～ 3-2）

雄では，100 mg/kg 群で投与 22 から 29 日および 36 から 43 日の平均 1 日摂餌量が対照群に比べ統計学的に有意な高値を示し，投与 22 から 48 日の累積摂餌量も有意な高値を示した．

雌では，交配前および妊娠期間は対照群と被験物質投与群との間に統計学的に有意な差は認められなかったが，哺育 0 から 4 日の平均 1 日摂餌量が対照群に比べ統計学的に有意な高値を示した．

11.1.4 器官重量（Table 4-1 ～ 4-2, Appendix 4-1 ～ 4-2）

雌雄とも対照群に比べ 25 および 100 mg/kg 群で肝臓の絶対および相対重量が統計学的に有意な高値あるいは高値傾向を示した．また，雄の 100 mg/kg 群で副腎の絶対および相対重量が有意な高値を示した．

11.1.5 剖検所見（Table 5-1 ～ 5-3, Appendix 5-1 ～ 5-2）

死亡した 100 mg/kg 群の雌 1 例（動物番号 2303）では，所見として胸腺の萎縮および肺の赤色化が観察された．

雄では妊娠を成立させなかった 6 および 100 mg/kg 群の各 1 例を含め，各群 12 例について剖検を行った．その結果，肝臓の肥大が 6, 25 および 100 mg/kg 群でそれぞれ 1, 2 および 9 例に観察され，対照群に比べ 100 mg/kg 群で統計学的に有意な発生率の増加が認められた．その他，肺の結節が 100 mg/kg 群で 1 例に，腎臓の嚢胞が 6 mg/kg 群で 1 例に観察された．

自然分娩した雌では，対照群，6, 25 および 100 mg/kg 群でそれぞれ 12, 11, 12 および 10 例について剖検を行った．その結果，肝臓の肥大が 100 mg/kg 群で 7 例に観察され，

対照群に比べ有意な発生率の増加が認められた．その他，100 mg/kg 群で副腎の肥大が 1 例，脱毛が 1 例，6 mg/kg 群で卵巣の嚢胞が 1 例，対照群で腎臓の白色斑点が 1 例に観察された．
妊娠 25 日に剖検し，妊娠不成立と判定された 6 および 100 mg/kg 群の各 1 例の雌では，異常所見は認められなかった．

11.1.6 組織所見（Table 6-1 ～ 6-5，Appendix 6-1 ～ 6-2）

妊娠 23 日に死亡した 100 mg/kg 群の雌では，胸腺の萎縮，肺の鬱血，肝臓の空胞変性，子宮の内腔拡張および副腎の空胞変性が観察された．
雄では，肝臓の空胞変性が対照群，6，25 および 100 mg/kg 群でそれぞれ 1（小葉周辺性），0，2（小葉中間帯：1 例，散発性：1 例）および 9（小葉中間帯）例に観察され（photo. 1，2），100 mg/kg 群で有意な発生率の増加が認められた．その他，肝臓では細胞浸潤が 3，7，1 および 1 例に，小肉芽腫が 7，6，5 および 7 例に，リンパ球浸潤が 6 mg/kg 群で 4 例に観察された．肝臓以外では，精巣上体の細胞浸潤が対照群で 5 例，100 mg/kg 群で 2 例に，副腎の球状帯空胞変性が対照群で 11 例，100 mg/kg 群で 9 例にそれぞれ観察された．また，剖検所見で認められた 6 mg/kg 群の腎臓の嚢胞は，組織学的には嚢胞と嚢胞周囲の尿細管好塩基化および線維化が観察された．
雌では，肝臓の空胞変性が対照群で 2 例，髄外造血が対照群で 6 例，100 mg/kg 群で 3 例，細胞浸潤が 100 mg/kg 群で 1 例ならびに小肉芽腫が対照群で 1 例，副腎の球状帯空胞変性が対照群で 3 例，100 mg/kg 群で 1 例にそれぞれ観察された．また，剖検所見で認められた対照群の腎臓の白色斑点は，組織学的には尿細管空胞変性ならびに好酸性小体が，100 mg/kg 群の皮膚の脱毛は，組織学的に毛嚢の萎縮が観察された．
妊娠を成立させなかった雄では，6 mg/kg 群の 1 例に肝臓の細胞浸潤，小肉芽腫，副腎の空胞変性が，100 mg/kg 群の 1 例に肝臓の空胞変性がそれぞれ観察された．妊娠不成立の雌では，6 mg/kg 群の 1 例に肝臓の小肉芽腫と子宮の内腔拡張が，100 mg/kg 群の 1 例に子宮の内腔拡張がそれぞれ観察された．

11.2 生殖発生毒性

11.2.1 交尾および受胎能（Table 7, Appendix 7-1 ～ 7-2）

交尾は，すべての群で全例成立した．受胎は，対照群および 25 mg/kg 群で全例成立したが，6 および 100 mg/kg 群の各 1 例（動物番号 2102, 2307）は不妊であった．したがって，受胎率は対照群および 25 mg/kg 群でそれぞれ 100 %，6 および 100 mg/kg 群でそれぞれ 91.7 %（12 例中 11 例）であった．

性周期観察では，平均性周期に群間差は認められなかった．異常性周期を示す動物が対照群，6, 25 および 100 mg/kg 群でそれぞれ 1, 3, 2 および 1 例認められたが，異常性周期発現率に群間差は認められなかった．

11.2.2 分娩および哺育（Table 8, Appendix 8, 10）

分娩状態に異常は観察されなかった．対照群に比べ 100 mg/kg 群の妊娠期間が統計学的に有意な延長を示し，25 mg/kg 群の出産児数および出産生児数が有意な減少を示した．その他の黄体数および着床痕数は各群ほぼ同様な値を示し，出産率，着床率，出生率，性比および生後 4 日生存率に群間差は認められなかった．

11.2.3 新生児の形態，体重および剖検所見（Table 9 ～ 11-2, Appendix 9, 11-1 ～ 11-2）

新生児の外表検査では，100 mg/kg 群で鎖肛，内反足および索状尾が同一個体の 1 例に認められた．

哺育 0 および 4 日の体重では，雌雄ともに 25 および 100 mg/kg 群で対照群に比べいずれの測定日も統計学的に有意な高値あるいは高値傾向を示した．

哺育期間中の死亡児の剖検では，胸腺頸部残留が対照群および 6 mg/kg 群の雄各 1 例，腎臓の腎盂拡大が 6 mg/kg 群の雄 1 例に認められたのみであった（Table, Appendix には示していない）．

哺育 4 日の剖検では，胸腺頸部残留が雄の 6, 25 mg/kg 群および雌の対照群，6 mg/kg 群でそれぞれ 1, 2, 1 および 1 例に認められた．その他，雄では肝臓の白色斑点および奇形結節，腎臓の嚢胞，尾の黒色化が，雌では肝臓の白色斑点，腎臓の腎盂拡大および尾の黒色化が各群で単発性に認められた．

12. 考察および結論

12.1 親動物（F0）に及ぼす影響

死亡が 100 mg/kg 群の雌で認められたが，病理所見からは死因を特定することができず，被験物質投与との関連は明らかではなかった．一般状態の変化として流涎が雄の 25 および 100 mg/kg 群，雌の 100 mg/kg 群で観察された．流涎は，28 日間反復経口投与毒性試験[1]においても 20 mg/kg 以上の投与群の雌雄で投与直後に一過性に認められており，被験物質投与の影響と考えられた．その他，観察された一般状態の変化は単発性の発生であり，被験物質とは関連のない変化と考えた．

体重には被験物質投与の影響は認められなかった．摂餌量では，100 mg/kg 群の雄および同群の哺育期間の雌に増加が認められたが，体重には反映しない変化であり，一貫した変化ではないことから被験物質投与の影響とは判断しなかった．

病理学的検査では，生殖器系に対して被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかったが，先に行われた 28 日間反復経口投与毒性試験[1] と同様のものと考えられる病変が肝臓に認められた．即ち，雌雄ともに 25 および 100 mg/kg 群で肝重量の増加が観察され，剖検所見では雌雄の 100 mg/kg 群で肝臓の肥大が，組織所見では雄の 25 および 100 mg/kg 群で微小な空胞変性が認められた．この微細空胞は，肝小葉の主として中間部に出現した．空胞を持つ肝細胞の核は中央に位置し Oil 赤 O 染色に陽性（photo. 3），ナイル青染色にも青染する（photo. 4）ことから，中性脂肪と共にリン脂質等を含む脂質の存在が示唆された．一方，雄で観察された空胞変性は雌では観察されなかった．この原因については不明であるが，妊娠から授乳期にかけて雌の肝臓における薬物代謝能が，非妊娠期と比べ異なること[7]に起因している可能性が示唆された．また，雄の 100 mg/kg 群で副腎重量が増加したが，組織所見では異常は認められなかった．その他観察された所見は，いずれも対照群と比較し発生頻度に差は認められないか，用量に関連しない発生であり，全て自然発生性の病変と考えられた．

以上のことから，本試験条件下における N－（1, 3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1, 4－ベンゼンジアミンの親動物に対する無影響量は，雌雄ともに 6 mg/kg/day と判断された．

12.2 生殖発生毒性

平均性周期，異常性周期発現率，交尾率および受胎率に被験物質投与の影響は認められなかった．100 mg/kg 群で妊娠期間の延長が認められたが，当施設で実施した過去 3 年間の経口投与簡易生殖毒性試験 3 試験および反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 4 試験の成績（各試験の対照群：22.4 ～ 22.7 日）と比較しても差はなく，被験物質投与の影響とは判断しなかった．また，25 mg/kg 群の出産児数および出産生児数が減少を示したが，用量に関連しない変化であった．その他，妊娠黄体数，着床痕数，性比，哺育 4 日生児数，出産率，着床率，出生率および生後 4 日生存率に被験物質投与の影響は認められなかった．100 mg/kg 群で認められた新生児の外表異常は 1 例のみの発現であり，自然発生性の変化であると考えられた．哺育 0 および 4 日の体重が雌雄ともに 25 および 100 mg/kg 群で高値を示したが，前述の試験の背景データ（哺育 0 日：雄 6.3 ～ 6.8 g，雌 6.0 ～ 6.4 g，哺育 4 日：雄 8.6 ～ 9.6 g，雌 8.3 ～ 9.3 g）と比較しても

差はなく，本試験の対照群の体重値が偶発的に低かったことに起因した変化と考えられた．哺育期間中の死亡児および哺育 4 日の出生児の剖検では，被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった．
以上のことから，N－（1, 3－ジメチルブチル）－N'－フェニル－1, 4－ベンゼンジアミンの生殖能および次世代児に対する影響はともに 100 mg/kg/day 投与によっても認められず，無影響量は 100 mg/kg/day と判断された．

13. 参考文献

1) 化学物質毒性試験報告，7, 520 (1999).

2) S. Gad and C. S. Weil, "Statistics and Experimental Design For Toxicologists", Telford Press, New Jersey, 1986, pp. 43-45.

3) 佐野正樹，岡山佳弘，医薬安全性研究会会報，32，21 (1990).

4) M, Yoshida, *J. Japanese Soc. Comp. Statist.*, 1, 111 (1988).

5) 佐久間昭，"薬効評価－計画と解析－Ⅰ"東京大学出版会，東京，1977, pp. 109-117.

6) 石居　進，"生物統計学入門"培風館，東京，1975, pp. 78-107.

7) 村田敏郎，"入門薬物代謝"講談社サイエンティフィック，東京，1993, pp. 130-131.

Figures

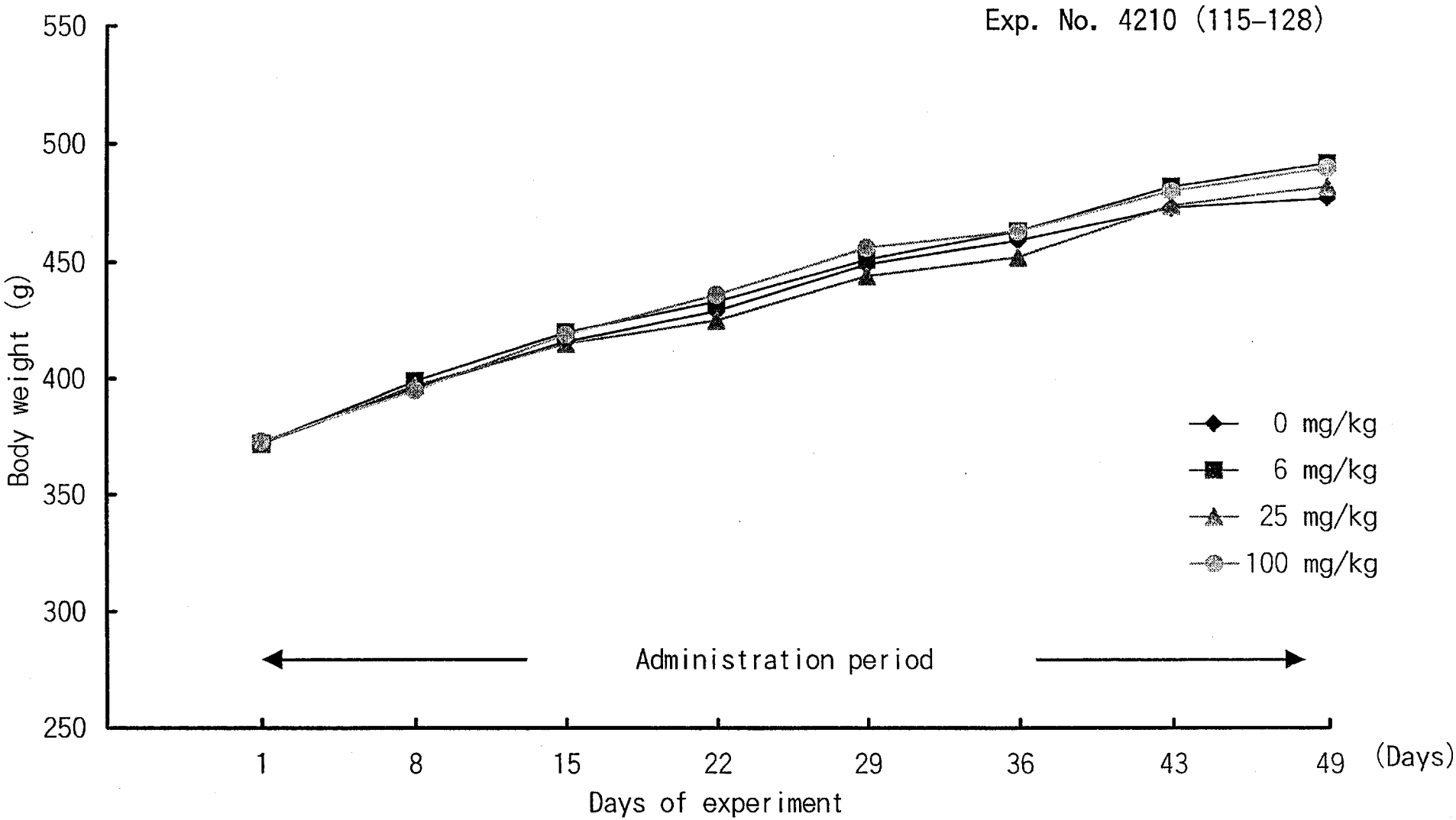

Figure 1 Body weight change of male rats

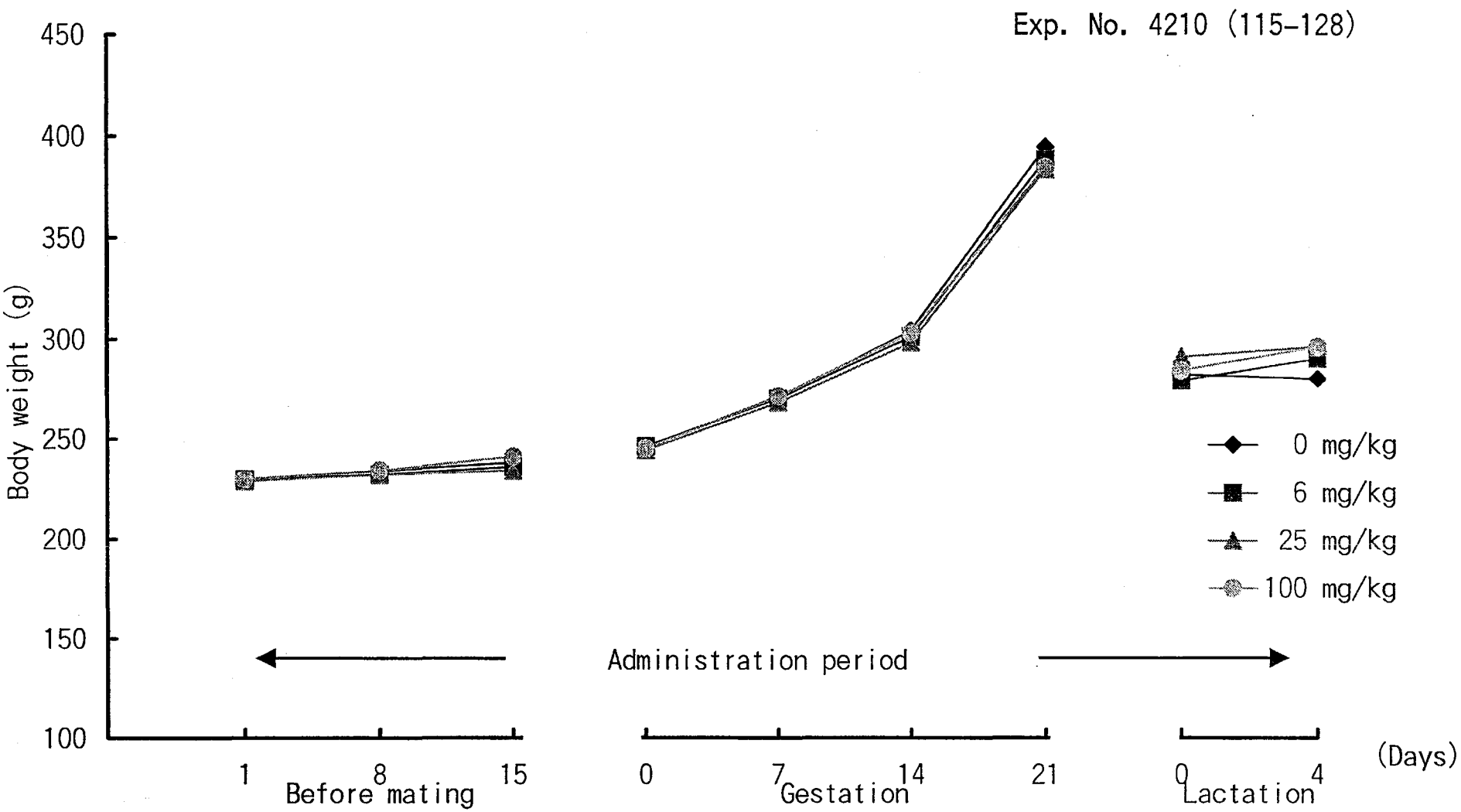

Figure 2 Body weight change of female rats

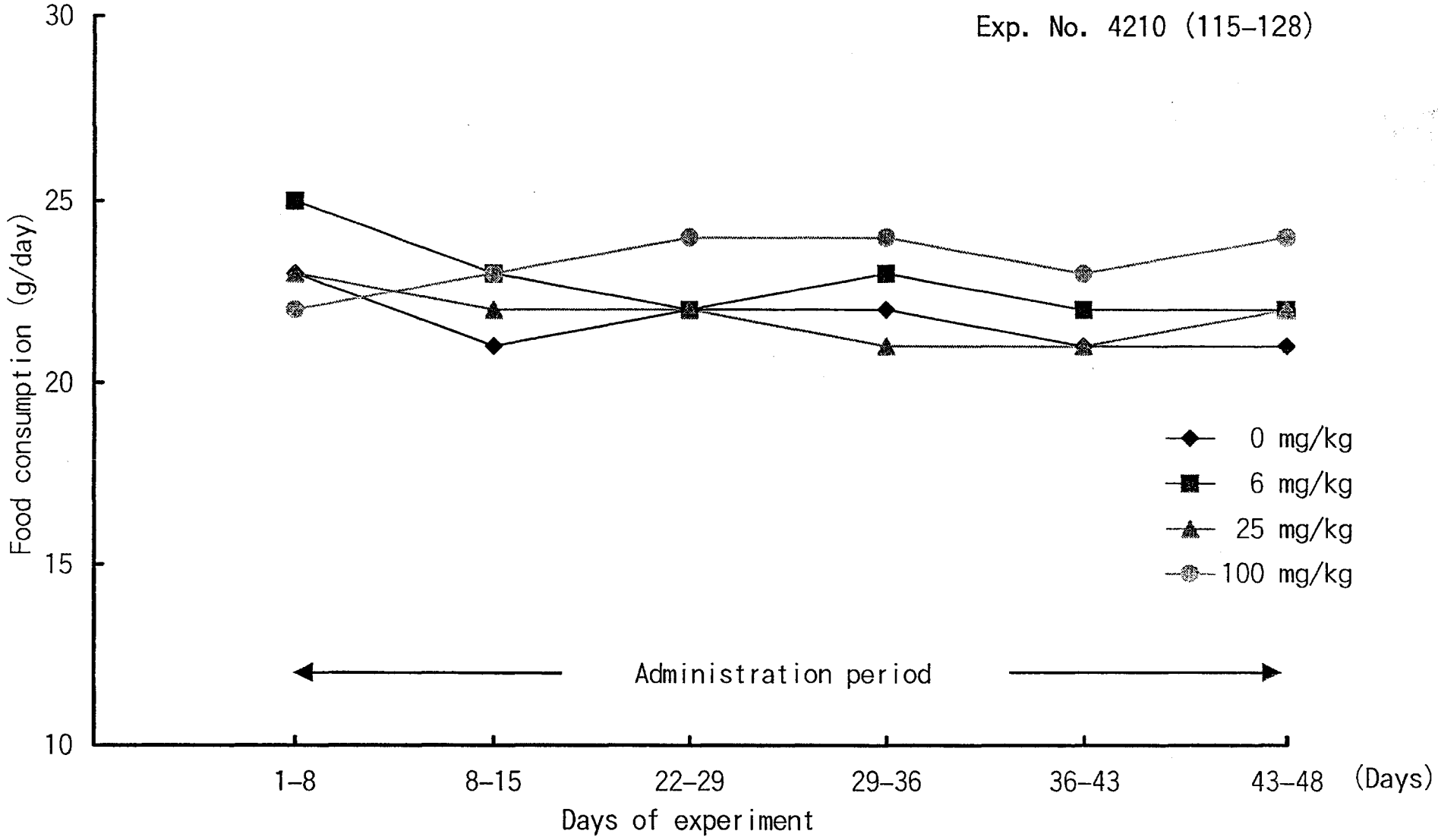

Figure 3 Food consumption of male rats

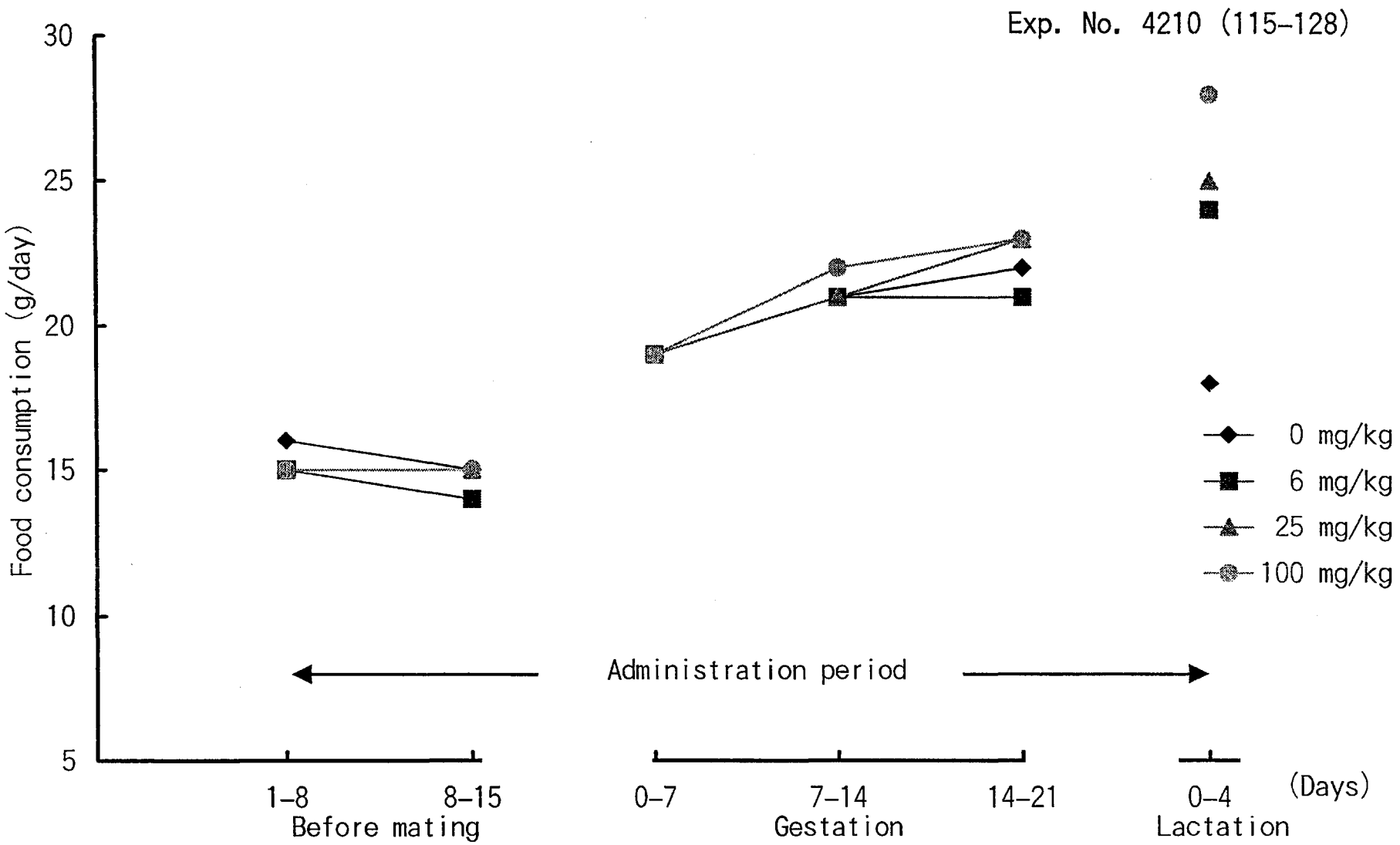

Figure 4 Food consumption of female rats

Tables

Table 1-1 Clinical observations in male rats Exp. No. 4210 (115-128)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment 1- 7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	Total (1-49)
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12	
	6	12	12	12	12	12	12	12	
	25	12	12	12	12	12	12	12	
	100	12	12	12	12	12	12	12	
normal	0	12	12	12	12	12	12	12	12
	6	12	12	12	12	12	12	12	12
	25	12	10	9	8	8	9	8	7
	100	11	8	6	5	3	3	6	2
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	2	3	4	4	3	4 a)	5 b)
	100	1	4	6	7	9	9	6	10

a) No. of animals with clinical sign in group
b) Total no. of animals with clinical sign in group

T-01

Table 1-2

Clinical observations in female rats
(Before and during mating period)

Exp. No. 4210 (115-128)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment 1- 7	8-14	15-21	22-28	29	Total (1-29)
number per group	0	12	12	12	0	0	
	6	12	12	12	1	1	
	25	12	12	12	0	0	
	100	12	12	12	0	0	
normal	0	12	12	12	0	0	12
	6	12	11	11	1	1	11
	25	12	12	12	0	0	12
	100	12	9	12	0	0	9
salivation	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0
	100	0	3 a)	0	0	0	3 b)
trauma	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	1	1	0	0	1
	25	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0

a) No. of animals with clinical sign in group
b) Total no. of animals with clinical sign in group

Table 1-3

Clinical observations in female rats
(Gestation period)

Exp. No. 4210 (115-128)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	6	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	25	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	100	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
normal	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	6	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	10
	25	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	100	11	8	9	10	11	11	11	10	11	7	7	10	6
dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
trauma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
crust	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	3	2	1	0	0	0	1	0	4	4	1	5

Table 1-3 -continued

Clinical observations in female rats
(Gestation period)

Exp. No. 4210 (115-128)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation 13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Total (0- 23)
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	
	6	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3	
	25	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	
	100	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	8	
normal	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	12
	6	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3	9
	25	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	12
	100	8	6	8	10	6	9	10	10	10	9	7	3
dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
trauma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
crust	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	3	5	3	0	4	1	0	0	0	1	0	8

Table 1-4

Clinical observations in female rats
(Lactation period)

Exp. No. 4210 (115-128)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of lactation 0	1	2	3	4	Total (0- 4)
number per group	0	12	12	12	12	12	
	6	11	11	11	11	11	
	25	12	12	12	12	12	
	100	10	10	10	10	10	
normal	0	12	12	12	12	12	12
	6	10	11	11	11	11	10
	25	12	12	12	12	12	12
	100	7	8	7	9	9	6
loss of hair	0	0	0	0	0	0	0
	6	1	0	0	0	0	1
	25	0	0	0	0	0	0
	100	1	1	1	1	1	1
salivation	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0
	100	3	1	3	0	0	4

Table 2-1 Body weight change of male rats Exp. No. 4210 (115-128)

Unit : g

Dose level (mg/kg)		0			6			25			100		
No. of animals		12			12			12			12		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of experiment	1	372	± 10	(12)	372	± 11	(12)	372	± 11	(12)	373	± 12	(12)
	8	396	± 10	(12)	399	± 14	(12)	397	± 16	(12)	395	± 17	(12)
	15	416	± 11	(12)	420	± 18	(12)	415	± 19	(12)	419	± 19	(12)
	22	429	± 15	(12)	433	± 20	(12)	425	± 21	(12)	436	± 21	(12)
	29	449	± 19	(12)	451	± 22	(12)	444	± 25	(12)	456	± 22	(12)
	36	459	± 21	(12)	463	± 23	(12)	452	± 30	(12)	463	± 29	(12)
	43	473	± 23	(12)	482	± 25	(12)	474	± 30	(12)	480	± 32	(12)
	49	477	± 29	(12)	492	± 30	(12)	482	± 29	(12)	490	± 37	(12)
Gain	1-49	105	± 22	(12)	120	± 25	(12)	110	± 21	(12)	117	± 26	(12)

Significant difference from control group; *: $p \leqq 0.05$ **: $p \leqq 0.01$

Table 2-2 Body weight change of female rats Exp. No. 4210 (115-128)

Unit : g

Dose level (mg/kg)		0			6			25			100		
Before mating period													
No. of animals		12			12			12			12		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of before mating	1	230	± 8	(12)	230	± 8	(12)	229	± 8	(12)	230	± 8	(12)
	8	234	± 9	(12)	232	± 9	(12)	232	± 11	(12)	234	± 10	(12)
	15	238	± 12	(12)	236	± 11	(12)	234	± 9	(12)	241	± 10	(12)
Gain	1-15	8	± 8	(12)	6	± 5	(12)	5	± 6	(12)	11	± 5	(12)
Gestation period													
No. of dams		12			11			12			11		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of gestation	0	246	± 11	(12)	246	± 13	(11)	244	± 12	(12)	245	± 10	(11)
	7	270	± 13	(12)	270	± 14	(11)	268	± 13	(12)	271	± 15	(11)
	14	304	± 16	(12)	301	± 15	(11)	298	± 15	(12)	303	± 16	(11)
	21	395	± 24	(12)	389	± 18	(11)	384	± 25	(12)	385	± 28	(11)
Gain	0-21	149	± 18	(12)	143	± 15	(11)	140	± 19	(12)	141	± 24	(11)
Lactation period													
No. of dams		12			11			12			10		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of lactation	0	282	± 16	(12)	279	± 20	(11)	291	± 18	(12)	284	± 20	(10)
	4	280	± 26	(12)	290	± 22	(11)	296	± 20	(12)	296	± 17	(10)
Gain	0- 4	-2	± 21	(12)	11	± 17	(11)	5	± 13	(12)	11	± 14	(10)

Significant difference from control group; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$

Table 3-1 Food consumption of male rats Exp. No. 4210 (115-128)

Unit : g/day

Dose level (mg/kg)		0			6			25			100		
No. of animals		12			12			12			12		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of experiment	1-8	23	± 2	(12)	25	± 2	(12)	23	± 2	(12)	22	± 2	(12)
	8-15	21	± 2	(12)	23	± 2	(12)	22	± 2	(12)	23	± 2	(12)
	22-29	22	± 2	(12)	22	± 2	(11)	22	± 2	(12)	24	± 3*	(12)
	29-36	22	± 2	(12)	23	± 2	(12)	21	± 2	(12)	24	± 3	(12)
	36-43	21	± 2	(12)	22	± 3	(12)	21	± 2	(12)	23	± 3*	(12)
	43-48	21	± 3	(12)	22	± 3	(12)	22	± 4	(12)	24	± 4	(12)
Cumulative consumption (g)	1-15	312	± 23	(12)	334	± 32	(12)	315	± 31	(12)	314	± 32	(12)
	22-48	554	± 54	(12)	583	± 63	(11)	559	± 51	(12)	621	± 78*	(12)

Significant difference from control group; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$

Table 3-2 Food consumption of female rats Exp. No. 4210 (115-128)

Unit : g/day

Dose level (mg/kg)		0			6			25			100		
Before mating period													
No. of animals		12			12			12			12		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of before mating	1- 8	16	± 2	(12)	15	± 1	(12)	15	± 2	(12)	15	± 2	(12)
	8-15	15	± 2	(12)	14	± 1	(12)	15	± 2	(12)	15	± 1	(12)
Cumulative consumption (g)	1-15	212	± 25	(12)	201	± 14	(12)	210	± 22	(12)	209	± 19	(12)
Gestation period													
No. of dams		12			11			12			11		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of gestation	0- 7	19	± 2	(12)	19	± 2	(11)	19	± 2	(12)	19	± 2	(11)
	7-14	21	± 2	(12)	21	± 2	(11)	21	± 2	(12)	22	± 2	(11)
	14-21	22	± 2	(12)	21	± 3	(11)	23	± 3	(12)	23	± 3	(11)
Cumulative consumption (g)	0-21	431	± 41	(12)	429	± 46	(11)	441	± 52	(12)	448	± 33	(11)
Lactation period													
No. of dams		12			11			12			10		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of lactation	0- 4	18	± 10	(12)	24	± 8	(11)	25	± 4	(12)	28	± 4**	(10)

Significant difference from control group; *: $p \leqq 0.05$ **: $p \leqq 0.01$

Table 4-1 Absolute and relative organ weight of male rats Exp. No. 4210 (115-128)

Dose level (mg/kg)		0		6		25		100	
No. of animal examined		12		12		12		12	
		Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.
Body weight (g)		477 ±	29	492 ±	30	482 ±	29	490 ±	37
Liver	(g)	16.03 ±	2.15	17.70 ±	2.25	17.84 ±	1.80	22.15 ±	2.92**
	(g%)	3.351 ±	0.336	3.585 ±	0.260	3.694 ±	0.196*	4.512 ±	0.364**
Adrenals	(mg)	51 ±	7	51 ±	6	53 ±	7	60 ±	8**
	(mg%)	10.639 ±	1.670	10.368 ±	1.219	11.049 ±	1.138	12.225 ±	1.524*
Testes	(g)	3.32 ±	0.24	3.42 ±	0.19	3.47 ±	0.16	3.45 ±	0.26
	(g%)	0.699 ±	0.071	0.698 ±	0.066	0.721 ±	0.044	0.708 ±	0.069
Epididymides	(mg)	1282 ±	80	1237 ±	56	1278 ±	78	1295 ±	98
	(mg%)	269.542 ±	23.244	252.121 ±	19.657	265.653 ±	20.186	265.780 ±	28.029

(%) (Organ weight / body weight) x 100
Significant difference from control group; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$

Table 4-2 Absolute and relative organ weight of female rats Exp. No. 4210 (115-128)

Dose level (mg/kg)		0		6		25		100	
No. of dams examined		12		11		12		10	
		Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.
Body weight (g)		280 ±	26	290 ±	22	296 ±	20	296 ±	17
Liver	(g)	11.14 ±	1.05	12.11 ±	1.21	13.12 ±	0.97**	15.24 ±	1.09**
	(g%)	3.977 ±	0.208	4.186 ±	0.342	4.430 ±	0.104**	5.161 ±	0.337**
Adrenals	(mg)	73 ±	12	67 ±	7	71 ±	9	79 ±	12
	(mg%)	26.479 ±	5.488	23.123 ±	2.059	24.058 ±	3.386	26.665 ±	3.507

(%) (Organ weight / body weight) x 100
Significant difference from control group; *: $p \leqq 0.05$ **: $p \leqq 0.01$

Table 5-1 Summary of gross findings (dead) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0	6	25	100
No. of animals necropsied		0	0	0	1
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
thymus	atrophic	-	-	-	1
RESPIRATORY SYSTEM					
lung	reddish	-	-	-	1

Table 5-2 Summary of gross findings (sacrificed and non-pregnancy) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	6	25	100
No. of animals necropsied		12	12	12	12
Organ	Findings				
RESPIRATORY SYSTEM					
lung	nodule	0	0	0	1
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	enlarged	0	1	2	9**
URINARY SYSTEM					
kidney	cyst	0	1	0	0

Significant difference from control group; * : P ≦ 0.05 ** : P ≦ 0.01

Table 5-3 Summary of gross findings (sacrificed) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0	6	25	100
No. of animals necropsied		12	11	12	10
Organ	Findings				
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	enlarged	0	0	0	7**
URINARY SYSTEM					
kidney	white patch/zone	1	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM					
ovary	cyst	0	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM					
adrenal gland	hypertrophic	0	0	0	1
INTEGUMENTARY SYSTEM					
hair	thin	0	0	0	1

Significant difference from control group; * : P ≦ 0.05 ** : P ≦ 0.01

Table 6-1 Summary of histological findings (dead) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				6				25				100			
No. of animals initially in study	0				0				0				1			
No. of animals necropsied	0				0				0				1			
No. of animals examined histologically	0				0				0				1			
Organ / Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
HEMATOPOIETIC SYSTEM																
thymus													(1)			
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
RESPIRATORY SYSTEM																
lung													(1)			
congestion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																
liver													(1)			
degeneration, vacuolar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM																
uterus													(1)			
dilatation, lumen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																
adrenal gland													(1)			
degeneration, vacuolar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Table 6-2-1 Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	6	25	100
No. of animals necropsied		12	11	12	11
Organ	Findings				
DIGESTIVE SYSTEM					
liver					
	degeneration, vacuolar	1	0	2	9**
	cellular infiltration	3	7	1	1
	cellular infiltration, lymphocyte	0	4*	0	0
	microgranuloma	7	6	5	7
URINARY SYSTEM					
kidney					
	basophilic tubules	-	1	-	-
	cyst	-	1	-	-
	fibrosis	-	1	-	-
REPRODUCTIVE SYSTEM					
epididymis					
	cellular infiltration	5	-	-	2
ENDOCRINE SYSTEM					
adrenal gland					
	degeneration, vacuolar	11	-	-	9

Significant difference from control group; * : P ≦ 0.05 ** : P ≦ 0.01

Table 6-2-2 Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				6				25				100			
No. of animals initially in study	12				11				12				11			
No. of animals necropsied	12				11				12				11			
No. of animals examined histologically	12				11				12				11			
Organ / Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
DIGESTIVE SYSTEM																
liver	(12)				(11)				(12)				(11)			
degeneration, vacuolar	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	1	0	-	8	0	1**
cellular infiltration	-	3	0	0	-	7	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0
cellular infiltration, lymphocyte	-	0	0	0	-	4	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
microgranuloma	-	7	0	0	-	6	0	0	-	5	0	0	-	7	0	0
URINARY SYSTEM																
kidney	(0)				(1)				(0)				(0)			
basophilic tubules	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
cyst	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
fibrosis	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
REPRODUCTIVE SYSTEM																
epididymis	(12)				(0)				(0)				(11)			
cellular infiltration	-	5	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																
adrenal gland	(12)				(0)				(0)				(11)			
degeneration, vacuolar	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.
Significant difference from control group; * : P ≦ 0.05 ** : P ≦ 0.01

Table 6-3-1 Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0	6	25	100
No. of animals necropsied		12	11	12	10
Organ	Findings				
DIGESTIVE SYSTEM					
liver					
	degeneration, vacuolar	2	-	-	0
	cellular infiltration	0	-	-	1
	microgranuloma	1	-	-	0
	hematopoiesis, extramedullary	6	-	-	3
URINARY SYSTEM					
kidney					
	degeneration, vacuolar	1	-	-	-
	eosinophilic body	1	-	-	-
ENDOCRINE SYSTEM					
adrenal gland					
	degeneration, vacuolar	3	-	-	1
INTEGUMENTARY SYSTEM					
skin					
	hair follicle atrophy	-	-	-	1

Significant difference from control group; * : P ≦ 0.05 ** : P ≦ 0.01

Table 6-3-2 Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				6				25				100			
No. of animals initially in study	12				11				12				10			
No. of animals necropsied	12				11				12				10			
No. of animals examined histologically	12				1				0				10			
Organ / Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
DIGESTIVE SYSTEM																
liver	(12)				(0)				(0)				(10)			
degeneration, vacuolar	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
cellular infiltration	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
microgranuloma	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
hematopoiesis, extramedullary	-	6	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0
URINARY SYSTEM																
kidney	(1)				(0)				(0)				(0)			
degeneration, vacuolar	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
eosinophilic body	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENDOCRINE SYSTEM																
adrenal gland	(12)				(0)				(0)				(10)			
degeneration, vacuolar	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
INTEGUMENTARY SYSTEM																
skin	(0)				(0)				(0)				(1)			
hair follicle atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				6				25				100			
No. of animals initially in study	0				1				0				1			
No. of animals necropsied	0				1				0				1			
No. of animals examined histologically	0				1				0				1			
Organ / Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
DIGESTIVE SYSTEM																
liver					(1)								(1)			
degeneration, vacuolar	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0
cellular infiltration	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0
microgranuloma	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																
adrenal gland					(1)								(1)			
degeneration, vacuolar	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Table 6-5 Summary of histological findings (non-pregnancy) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				6				25				100			
No. of animals initially in study	0				1				0				1			
No. of animals necropsied	0				1				0				1			
No. of animals examined histologically	0				1				0				1			
Organ / Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
DIGESTIVE SYSTEM																
liver					(1)								(1)			
microgranuloma	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM																
uterus					(1)								(1)			
dilatation, lumen	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Table 7 Copulation and fertility results in rats Exp. No. 4210 (115-128)

Dose level (mg/kg)	0	6	25	100
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	12	12	12
No. of pregnant females	12	11	12	11
Copulation index (%) 1)	100.0	100.0	100.0	100.0
Fertility index (%) 2)	100.0	91.7	100.0	91.7
Estrus cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Mean estrus cycle (days, Mean±S.D.)	4.1± 0.3	4.3± 0.4	4.1± 0.4	4.2± 0.4
Irregular cycle a) (%) 3)	1 (8.3)	3 (25.0)	2 (16.7)	1 (8.3)

1) (No. of animals with successful copulation / no. of animals mated) x 100
2) (No. of pregnant animals / no. of animals with successful copulation) x 100
3) (No. of animals having irregular estrus cycle/ no.of animals examined) x 100
a) No. of animals having irregular estrus cycles
Values in parentheses are expressed no. of animals observed
Significant difference from control group; *: P ≦ 0.05 **: P ≦ 0.01

Table 8 Findings of delivery in dams(F0) Exp. No. 4210 (115-128)

Dose level (mg/kg)	0	6	25	100
No. of dams observed	12	11	12	10
No. of dams delivered live pups	12	11	12	10
Duration of gestation (Mean ±S.D.)	22.2 ± 0.4	22.3 ± 0.5	22.4 ± 0.5	22.7 ± 0.5*
No. of total corpora lutea (Mean ±S.D.)	241(20.1± 4.4)	198(18.0± 2.3)	203(16.9± 3.0)	181(18.1± 3.2)
No. of total implants (Mean ±S.D.)	195(16.3± 1.9)	167(15.2± 1.0)	166(13.8± 2.8)	150(15.0± 1.6)
No. of total pups born (Mean ±S.D.)	184(15.3± 2.5)	160(14.5± 1.0)	149(12.4± 2.4)*	131(13.1± 2.9)
No. of total live pups born (Mean ±S.D.)	183(15.3± 2.5)	158(14.4± 0.9)	148(12.3± 2.3)*	131(13.1± 2.9)
Male	91(7.6± 2.0)	76(6.9± 2.1)	75(6.3± 2.1)	73(7.3± 2.1)
Female	92(7.7± 2.6)	82(7.5± 2.2)	73(6.1± 2.3)	58(5.8± 2.8)
Sex ratio (Mean ±S.D.)	1.17± 0.65	1.08± 0.58	1.24± 0.89	1.57± 0.77
No. of total live pups on day 4 (Mean ±S.D.)				
Male	81(6.8± 2.7)	74(6.7± 1.9)	74(6.2± 2.2)	72(7.2± 2.2)
Female	78(6.5± 2.9)	80(7.3± 2.1)	71(5.9± 2.4)	57(5.7± 2.8)
No. of total dead pups (Mean ±S.D.)	1(0.1±0.3)	2(0.2±0.4)	1(0.1±0.3)	0(0.0±0.0)
No. of total cannibalism (Mean ±S.D.)	0(0.0±0.0)	0(0.0±0.0)	0(0.0±0.0)	0(0.0±0.0)
Gestation index (%) 1)	100.0	100.0	100.0	90.9
Implantation index (%,Mean±S.D.) 2)	82.9± 12.3	85.2± 9.0	82.4± 13.9	84.2± 10.8
Delivery index (%,Mean±S.D.) 3)	93.9± 7.8	95.9± 4.2	90.3± 7.4	87.8± 18.0
Live birth index (%,Mean±S.D.) 4)	99.5± 1.7	98.8± 2.6	99.4± 2.1	100.0± 0.0
Viability index on day 4 (%,Mean±S.D.) 5)				
Male	88.2± 28.6	98.2± 6.0	98.3± 5.8	98.3± 5.3
Female	88.7± 26.2	97.9± 4.9	95.8± 10.4	98.6± 4.5

1) (No. of females with live pups / no. of pregnant females) x 100
2) (No. of implants / no. of corpora lutea) x 100
3) (No. of pups born / no. of implants) x 100
4) (No. of live pups born / no. of pups born) x 100
5) (No. of live pups on day 4 after birth / no. of live pups born) x 100
Significant difference from control group; *: $p \leqq 0.05$ **: $p \leqq 0.01$

Table 9 External observations on live pups(F1) from rats Exp. No. 4210 (115-128)

Dose level (mg/kg)	0	6	25	100
No. of litters	12	11	12	10
No. of live pups examined	183	158	148	131
No. of live pups with external anomalies (%,Mean±S.D.)	0 -	0 -	0 -	1 1.0± 3.2
Type and incidence of external anomalies (%) 1)				
Imperforate anus	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)
pes varus	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)
filamentous tail	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)

1) (No. of live pups with external anomalies / no. of live pups examined) x 100
Significant difference from control group; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$

Table 10 Body weight change of pups(F1) from rats Exp. No. 4210 (115-128)

Unit : g

Dose level (mg/kg)		0		6		25		100	
No. of litters		12		11		12		10	
		Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)
Male									
Days after birth	0	5.9 ± 0.4	(12)	6.1 ± 0.5	(11)	6.6 ± 0.7**	(12)	6.6 ± 0.5**	(10)
	4	7.8 ± 1.6	(11)	8.6 ± 1.4	(11)	9.7 ± 1.4*	(12)	9.3 ± 1.5	(10)
Female									
Days after birth	0	5.6 ± 0.4	(12)	5.8 ± 0.5	(11)	6.2 ± 0.6*	(12)	6.2 ± 0.5*	(10)
	4	7.2 ± 1.8	(12)	8.3 ± 1.2	(11)	9.2 ± 1.4**	(12)	8.8 ± 1.5*	(10)

Significant difference from control group; *: $p \leqq 0.05$ **: $p \leqq 0.01$

Table 11-1 Summary of gross findings of pups(F1) from rats(sacrificed) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	6	25	100
No. of pups necropsied		81	74	74	72
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
thymus	thymic remnant in the neck	0	1	2	0
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	white patch/zone	0	0	1	0
	malformative nodule	0	0	0	1
URINARY SYSTEM					
kidney	cyst	0	0	1	0
INTEGUMENTARY SYSTEM					
tail	black	0	1	0	0

Significant difference from control group; *: $p \leqq 0.05$ **: $p \leqq 0.01$

Table 11-2 Summary of gross findings of pups(F1) from rats(sacrificed) Exp. No. 4210 (115-128)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0	6	25	100
No. of pups necropsied		78	80	71	57
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
thymus	thymic remnant in the neck	1	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	white patch/zone	0	0	0	1
URINARY SYSTEM					
kidney	dilated pelvis	1	1	0	0
INTEGUMENTARY SYSTEM					
tail	black	1	0	0	0

Significant difference from control group; *: $p \leqq 0.05$ **: $p \leqq 0.01$