

食薬セ研第12-1890号

2002年 7月 1日

N-フェニル-*N'*-イソプロピル-
α-フェニレンジアミンの
ラットを用いる急性経口毒性試験

厚生労働省医薬局審査管理課 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦 野 研 究 所

【目 次】

要 約	1
緒 言	2
試験方法	3
1. 被験物質	3
2. 使用動物および飼育方法	3
3. 投与検体	4
4. 群および群分け	4
5. 投与方法	5
6. 観察および検査	5
7. データの解析	6
結果	8
1. 死亡例	8
2. 一般状態	8
3. 体重	9
4. 病理学検査	9
考察	12
参考文献	14
Fig. 1、2	15
Table 1～5	17

【要 約】

N-フェニル-N'-イソプロピル-p-フェニレンジアミン（以下、PIPDと略）の急性経口毒性試験を雌雄の Sprague-Dawley 系ラットを用いて実施した。雌雄とも被験物質を 269、350、455、592、769 および 1000 mg/kg の用量で投与する被験物質投与群および媒体である 0.5%カルメロースナトリウム水溶液を投与する対照群の計 7 群を設け、各群 5 匹、雌雄計 70 匹の動物に単回強制経口投与した。主な結果を以下に要約する。

観察第 3 日から第 5 日にかけて、雄では 269、350、455、592、769 および 1000 mg/kg 投与群のそれぞれ 5 例中 1、1、2、4、4 および 3 例が死亡し、雌では 592、769 および 1000 mg/kg 投与群のそれぞれ 5 例中 3、2 および 5 例が死亡した。

投与日から淡赤色ないし淡褐色尿、うずくまりおよび閉眼が、加えて、観察第 2 日以降は、排便量の減少および皮膚色蒼白が観察され、一部の例で強い黄色調を示す尿および腹部膨満が認められた。死亡例では腹臥位姿勢、よろめき、呼吸数の減少、流涙、体表温の低下も散見された。生存例では、いずれの所見も観察第 11 日までに回復した。

観察第 2 日ないし第 4 日に雌雄とも各被験物質投与群で、体重減少ないし増加が抑制されたが、観察第 8 日以降は順調に増加した。

剖検時には、死亡例で肝臓の腫大、腎臓の腫大ないし淡色化が観察され、胸水、腹水、肺の水腫様変化、脾臓の小型化および淡色化、前胃粘膜の剥離、赤色領域、腺胃粘膜の白濁、肥厚、皮下組織の黄色化などが認められた。生存例では、前胃粘膜の白濁および肥厚が観察された。

組織学検査では、死亡例で小葉中心性の肝細胞壊死ないし変性ならびに肝細胞の肥大が観察され、近位尿細管上皮の変性あるいは壊死、肺胞水腫、前胃粘膜下織の出血および浮腫、腺胃粘膜の出血およびびらんが認められた。生存例では、小葉中心性の肝細胞肥大および肝細胞の分裂像ならびに再生尿細管が散見され、一部の例で肺の好中球および泡沫細胞浸潤、前胃の褐色色素沈着ならびに腺胃の再生上皮が認められた。また、雄で脾臓の髄外造血が増加した。

以上の結果より算出した PIPD の LD₅₀ は、雄で 522 mg/kg（95%信頼限界は 224 ～ 1154 mg/kg）、雌では 701 mg/kg であった。また、PIPD 投与により肝臓および腎臓が障害され、肺胞水腫、胃粘膜の浮腫および前胃粘膜下織の出血、胸水および腹水の貯留、皮下組織の黄色化などが観察されることが明らかとなった。また、皮膚色蒼白および生存例の脾臓における髄外造血の増加から溶血性貧血が起きた可能性が示唆された。

【結 言】

N-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミン（以下、PIPDと略記）は、タイヤやラテックス手袋等のゴム製品の酸化防止剤として幅広く使用されている化学物質であり、旧西独基準では製品の1.5 %迄、米国食品医薬品局（FDA）では製品の5 %迄の含有が許可されている¹⁾。安全性については、感作性を中心に報告されており^{1) - 5)}、PIPDを老化防止剤として使用したゴム配合物のみならず、PIPD単独でも人体に対するパッチテストで刺激性が確認されている^{2)、3)}。また、LD₅₀については、720 mg/kg から7500 mg/kg 以上まで、幾つかの値がPIPDの製品別に報告されている^{1)、6)、7)}。

今回、OECD既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、PIPDの安全性確認のために、ラットにおける急性経口投与毒性試験を実施したのでその結果を報告する。

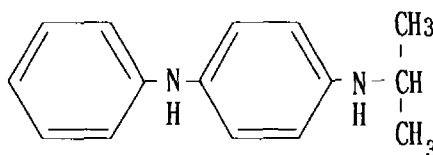
本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401] 急性経口毒性試験」（1987年2月24日採択）および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号、平成12年3月1日改正、環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号）に準拠して実施した。

【試 験 方 法】

1. 被験物質

N-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-フェニレンジアミン（英名 *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine、略称 PIPD）は別名 1-フェニルアミノ-4-イソプロピルアミノベンゼン、CAS No. 101-72-4、分子量 226.32、分子式 $C_{15}H_{18}N_2$ 、融点 76.5～78.5℃、沸点 220℃（10 mmHg）、蒸気圧（90℃）0.00343 mmHg の紫褐色のフレーク状の固体である（構造式については下図参照）。本試験には、製品名 オゾノン 3C、ロット番号 純度 99.5 %、不純物として4-アミノジフェニルアミンを 0.04 %、*N*-フェニル-*N'*-ジイソプロピル-*p*-フェニレンジアミンを 0.34 % 含み、アセトンに 10～50 mg/mL（20℃）、DMSOおよび95%エタノールに 1～10 mg/mL（18℃）、水に 1 mg/mL（18℃）の溶解性を有する物質を被験物質として使用した。受領した被験物質は、使用時まで室温にて保管した。また、動物試験終了後、被験物質提供者である にて、本被験物質の純度を測定した結果 99.7 %であったことから、試験期間中の被験物質の安定性が確認された。

<構造式>



2. 使用動物および飼育方法

4週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS、SPF] 雌雄ラット（日本チャールス・リバー(株)、厚木飼育センター）を購入し、検疫と飼育環境への馴化を兼ねて入荷日を含め 8 日間予備飼育した。試験には、検疫・馴化期間中、一般状態の異常が認められなかった雌雄各35匹を使用した（注1）。動物は、許容温度21.0～25.0℃、許容湿度40.0～75.0%、換気回数約15回/時、照明12時間（7時～19時）に制御された飼育室内で、金属製金網床

（注1）動物入荷日： 2001年4月16日 入荷匹数： 雄39匹 雌39匹
 入荷時体重： 雄 78.7～94.9 g（平均 85.7 g）
 雌 66.2～77.2 g（平均 71.5 g）

投 与 日： 2001年4月24日
投与時体重： 雄 121.6～139.8 g（平均 131.1 g）
 雌 96.1～113.5 g（平均 105.3 g）

（注2）動物飼育期間中における温湿度の実測値
 温度 22.0～24.0℃ 湿度 51～62%

ケージ（220W×270D×190Hmm）に1匹ずつ収容し、固型飼料（CE-2、日本クレア[®]）と水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取（ただし、投与前約18時間から投与後約3時間にかけては絶食）させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温度の実測値は許容範囲内にあり（前頁注2）、供給した飼料および水道水の分析結果では、試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。動物には、個体識別のため、フェルトペンで尾に動物番号を標識した。また、識別の補助として、群ごとに色彩の異なる動物カードに、試験計画番号、性別、群（投与量）および動物番号を記入し、飼育ケージに掛けた。

3. 投与検体

分析粉碎器 R-8（日本理化学器械[®]）で粉碎した被験物質を秤量し、乳鉢で磨砕後、媒体である 0.5%カルメロースナトリウム水溶液〔英語表記 0.5% carmellose sodium solution、略称 0.5% CMC Na、日局カルメロースナトリウム（ロット番号6Z09、丸石製薬[®]）を 0.5%の濃度となるように日局注射用水（ロット番号 9912ST、光製薬[®]）に溶解させたもの〕を少量ずつ加えながら練り混ぜて懸濁液を調製し、次に、コンディショニングミキサーあわとり練太郎（AR-360M、[®]シンキー）を用いてミキシングした後、全量を所定量に合わせ、高用量群の投与検体を調製した。この高用量群の投与検体を 1.3 倍ずつ段階希釈し、再度ミキシングして他群の投与検体を調製した。本試験に先立ち、0.10、2.00 および 10.0 w/v%に調製した検体について、被験物質の冷暗所（冷蔵庫内）における安定性試験を実施した結果、0.10 および 2.00 w/v%の検体は2日間、10.0 w/v%の検体は8日間の安定性が確認されたため（Appendix A）、投与前日に調製した投与検体は、使用時まで冷蔵庫にて保管した。また、投与検体について、含量測定および均一性試験を実施した結果（Appendix B）、被験物質の平均含量は所定濃度の92.0～101%であり、均一性は良好であることが確認された。なお、投与検体中の被験物質測定方法についてはAppendix Cに示した。

4. 群および群分け

用量は、本試験に先立って実施した予備試験（試験計画番号 A-00-063）の成績を基に決定した。即ち、0、100、300、1000、1500 および 2000 mg/kg の用量（投与検体は 10 w/v%が調製限界であったため、100、300 および 1000 mg/kg 投与群には、それぞれ 1.0、3.0 および 10 w/v%の投与検体を 10 mL/kg の容量で投与し、1500 および

2000 mg/kg 投与群については、10 w/v%の検体をそれぞれ 15 および 20 mL/kg の容量で投与した)を雌雄動物に単回投与した結果、1000 mg/kg 以上の投与群では、観察第2日(投与日=観察第1日)から5日にかけて 1000 mg/kg 投与群の雄1例を除く全例が死亡し、300 mg/kg 以下の投与群では死亡例はなかった。また、1000 mg/kg 以上の用量間では死亡時期および一般状態に大差がなかったため、被験物質濃度の影響の検討として、雄動物を用いて 0、500 (5 w/v%)、1000 (5 w/v%) および 1000 (10 w/v%) mg/kg の用量で追加投与群を設け、被験物質をより十分に磨碎して検体を調製し、投与した。その結果、500 mg/kg 投与群で3例中2例が死亡し、1000 mg/kg 投与群では濃度にかかわらず、全例が死亡した。これらの結果から、高用量を 1000 mg/kg に設定し(被験物質濃度 10 w/v%)、以下、公比約 1.3で除して 769、592、455、350、269 mg/kg の全6用量を設定した。なお、性差が否定できなかったため、雌雄両性について試験を実施することとした。

群分けは、検疫終了時の体重をもとに体重別層化無作為抽出法により行った。各群の投与量および動物番号等を以下に示した。

群識別	投与物質	投与用量 (mg/kg)	濃 度 (w/v %)	投与容量 (mL/kg)	動 物 番 号	
					雄	雌
対照	0.5%CMC Na	0	-	10	1 ~ 5	36 ~ 40
低用量	PIPD	269	2.69	10	6 ~ 10	41 ~ 45
中用量 1	PIPD	350	3.50	10	11 ~ 15	46 ~ 50
中用量 2	PIPD	455	4.55	10	16 ~ 20	51 ~ 55
中用量 3	PIPD	592	5.92	10	21 ~ 25	56 ~ 60
中用量 4	PIPD	769	7.69	10	26 ~ 30	61 ~ 65
高用量	PIPD	1000	10.0	10	31 ~ 35	66 ~ 70

5. 投与方法

投与経路は経口とし、動物をあらかじめ約18時間絶食させた後、ラット用胃管を用いて強制的に単回投与した。投与容量は 10 mL/kg とし、投与液量は投与直前に測定した体重を基に個体別に算出した。なお、投与経路および方法ならびに投与回数は、OECD化学物質試験法ガイドラインに従って決定した。

6. 観察および検査

1) 一般検査

投与日を観察第1日として第15日まで毎日死亡例の有無を確認し、以下の項目について

データを収集した。一般状態の観察は、生存例全例について、投与日には投与後約 1 時間にわたり継続的に、その後約 1 時間間隔で投与後 6 時間まで行い、観察第 2 日から 15 日までは毎日 1 回以上の頻度で行った。体重は、投与直前、第 2、4、8、11 および 15 日に生存例全例について測定したほか、死亡例については死亡発見時に測定した。

2) 病理学検査

死亡例は死亡後速やかに、また、生存例については観察第 15 日に剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した（注 3）。また、死亡例全例および生存例の選抜例（雌雄各群から最も動物番号が若い 1 例を選抜）について、主要器官・組織（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管）および肉眼的に変化が認められた器官・組織を 0.1 M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に固定保存した。なお、選抜外の生存例で選抜例と異なる肉眼的変化が認められた場合には、その器官・組織も固定保存することとしたが、該当例はなかった。組織学検査は、剖検時に肉眼所見が観察された胃、肺、肝臓、脾臓および腎臓について、器官・組織を固定保存した全例を対象に行った。

なお、屠殺はペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血することにより行った。

7. データの解析

1) 体重

各群毎に平均値と標準偏差を求めた。対照群と各被験物質投与群との平均値の差の検定は、観察期間を通して生存例が 3 匹以上の群が対照群を含めて 3 群以上あったため、多重比較を用いた。即ち、Bartlett の方法により分散の一意性について検定（有意水準：5 %）し、分散が一様である場合には一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性（有意水準：5 %）が認められた場合は、Dunnett 法により多重比較を行った。分散が一様でない場合は Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性（有意水準：5 %）が認められた場合には、Dunnett 型の検定法で多重比較を行った。

（注 3）剖検時の肉眼的観察器官・組織

脳、下垂体、眼球、甲状腺、心臓、気管、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、消化管、生殖器、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髓、膵臓、顎下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚、病変部。

2) LD₅₀の算出

観察期間中の死亡例数をもとに死亡率を算出した。雄では、死亡率が0%または100%以外となる投与群が3群以上存在し、かつ死亡率の直線性が得られたため、統計解析ソフトウェア SAS®を用いて Probit 法によりLD₅₀を95%信頼限界と併せて求めた。雌は、死亡例は認められたもののこの条件に満たなかったため、Behrens 法によりLD₅₀を推測した。

【 結 果 】

1. 死亡例 (Table 1)

投与日から観察第2日まではいずれの投与群においても死亡例はなかったが、観察第3日から第5日にかけて、269 および 350 mg/kg 投与群の雄各1例 (M-8、M-11、以下同様に、性別を表す雄の Mまたは雌の Fの記号 - 動物番号と略)、455 mg/kg 投与群の雄2例 (M-19、20)、592 mg/kg 投与群の雄4例雌3例 (M-22~25およびF-56、59、60)、769 mg/kg 投与群の雄4例雌2例 (M-27~30およびF-62、65) および 1000 mg/kg 投与群の雄3例雌5例 (M-32、34、35およびF-66~70) が死亡したが、死亡時期は用量依存的ではなかった。死亡率を基に算出方法を選択し、得られた LD_{50} は、Probit 法を用いた雄で 522 mg/kg (95%信頼限界は 224~1154 mg/kg)、Behrens 法を用いた雌ではおよそ 701 mg/kg となった。

2. 一般状態 (Table 1)

投与後3時間以降観察第7日までの間に、雄の 269、350 および 455 mg/kg 投与群の各1例を除く雌雄の被験物質投与群全例で、淡赤色ないし淡褐色尿が観察された。この着色尿の発現時期は群間で差がなかったが、回復は用量依存的に遅延した。また、投与後4時間以降観察第5日までの間に、雄の 269 mg/kg 投与群および 455 mg/kg 以上の投与群ならびに雌の 350 mg/kg 以上を投与した群でうずくまり姿勢が、雄の 350 mg/kg 以上を投与した群ならびに雌の 592 mg/kg 以上を投与した群で閉眼が観察された。うずくまり姿勢および閉眼はより高い用量で早く発現し、例数も多い傾向にあった。投与日にはこのほかに一般状態の変化は観察されなかった。

観察第2日には、269 mg/kg 投与群の雄4例雌2例、350 mg/kg 投与群の雄5例雌4例、455 mg/kg 以上を投与した群の雌雄全例で排便量が減少し、個体によっては観察第7日まで継続した。また、観察第2日から第5日にかけて、雄の 269 mg/kg 投与群および雌雄の 350 mg/kg 以上を投与した群の多数例で皮膚色が蒼白となった。さらに、観察第3日から第10日の間に、強い黄色調を示す尿が、雄の各被験物質投与群ならびに雌の 769 および 1000 mg/kg 投与群の一部の動物で認められ、観察第4日から第10日までの間に、雄の 769 mg/kg 投与群の1例および 1000 mg/kg 投与群の雄2例雌1例では、腹部膨満が観察された。その他、観察第2日から第4日にかけて、雄の 350 mg/kg 投与群な

らびに雌の 269 mg/kg 投与群および 592 mg/kg 以上を投与した群で被毛の汚れが散見された。生存例では、雌雄とも観察第11日以降、一般状態の変化は観察されなかった。

死亡例では、死期が迫るに従って、上記の所見に加えて腹臥位姿勢、よろめき、呼吸数の減少、流涙、体表温の低下などが散見された。なお、死亡例の所見に群間の差はなかった。

3. 体重 (Table 2、3)

観察第2日の測定では、雌雄とも全ての被験物質投与群で、観察第4日の測定では、雌の 269 mg/kg 投与群を除く全ての被験物質投与群で、体重減少ないし増加が抑制される傾向が認められ、観察第2日の雄の 455 および 1000 mg/kg 投与群で、対照群と比較して有意に低値となった。いずれの被験物質投与群も観察第8日までに増加に転じ、以降、順調に増加した。なお、対照群では、雌雄いずれの個体も投与日から観察終了日まで順調な体重増加を示した。

4. 病理学検査

1) 剖検所見 (Table 4)

①死亡例 (雄15例雌10例)

死亡例では、肝臓、腎臓、肺、胸腔、腹腔、脾臓、前胃、腺胃で以下に示すような変化が観察された。

肝臓は、雄12例雌3例で腫大していた。また、腎臓では、雄8例雌3例で腫大が、雌1例で淡色化が認められた。

肺では、雄10例雌全例で水腫様変化が観察され、雄10例で暗赤色点ないし暗赤色領域が、雌5例で暗色化が認められた。

胸腔には胸水が貯留し、雄1例および雌4例で無色透明、雄6例で赤色調を呈した。また、腹腔には腹水が観察され、雌2例で無色透明、雄3例および雌3例で赤色調を呈した。

脾臓では、観察第3日の一般状態観察後に死亡した(16時に死亡発見)雄1例および観察第4日および第5日に死亡した雌雄全例(雄7例雌3例)で小型化および淡色化が認められた。

前胃粘膜は、雄12例雌6例で剥離し、雄10例雌9例で暗色から赤色調を呈する点また

は領域が観察されたほか、白濁および陥凹部がそれぞれ雄1例で認められた。腺胃粘膜は、雄8例雌5例で肥厚し、雄11例雌9例で白濁が、雌雄各5例で陥凹部が観察され、雄5例雌3例で暗色から暗赤色調を呈する点または領域が認められた。

この他、観察第3日の一般状態観察後に死亡した雄1例および観察第4日に死亡した雄2例雌3例では、皮下組織の黄色化が認められた。

②観察期間終了時屠殺例（生存例）

前胃粘膜では、455 および 592 mg/kg 投与群でそれぞれ雌5例中1例および雌2例中1例、769 mg/kg 投与群で雄1例中1例および雌3例中2例、1000 mg/kg 投与群で雄2例全例に白濁および肥厚が観察された。この他には、いずれの例の器官・組織にも異常所見は認められなかった。

2) 組織学検査所見 (Table 5)

①死亡例（雄15例雌10例）

剖検時に変化が観察された肝臓、腎臓、肺、脾臓および胃で以下に示すような所見があった。

肝臓では、592 および 769 mg/kg 投与群の雌各1例を除く雌雄全例で、軽微から中等度の小葉中心性肝細胞の壊死ないし変性が観察された。また、雄9例雌9例で肝細胞の肥大が認められた。

腎臓では、雄12例雌6例で近位尿細管上皮の変性あるいは壊死がみられ、雄は雌に比較して変化の程度が強い傾向にあった。また、雄10例雌8例で近位尿細管管腔に細胞片と考えられる顆粒円柱が観察され、1000 mg/kg 投与群の雌4例で遠位尿細管管腔の拡張が認められた。

肺では、269 および 455 mg/kg 投与群の雄各1例を除く雌雄全例で、軽度から強度の肺胞水腫が観察された。この他、雄8例雌6例で肺胞の出血が、雄6例雌8例で泡沫細胞浸潤が観察され、雌3例では好中球浸潤が認められた。

脾臓では、雌雄全例で萎縮が観察され、1000 mg/kg 投与群の雌2例で髄外造血の増加が認められた。

前胃では、雄12例雌9例で粘膜下組織の出血が、雄10例雌8例で粘膜下組織の浮腫が観察され、雄4例雌7例でびらんが、雄10例雌2例で粘膜上皮の空胞変性が、雄12例雌10例で好中球浸潤が認められた。腺胃では、雄7例雌5例でびらんが、雄5例雌4例で粘膜

の出血が、粘膜下織の浮腫ないし好中球浸潤がそれぞれ雄 1 例に認められた。

②観察期間終了時屠殺例（生存例）

観察期間終了時まで生存した各群それぞれ 1 例について行った組織学検査では、剖検時に変化があった胃のほか、肝臓、腎臓、肺および脾臓で以下に示すような所見があった。

肝臓では、455 mg/kg 以上を投与した雄の各群および 769 mg/kg 投与群の雌で、小葉中心性の肝細胞肥大が観察され、769 および 1000 mg/kg 投与群の雄で肝細胞の分裂像の増加が認められた。また、455 mg/kg 以上を投与した雄の各群ならびに雌の対照群、350 mg/kg 投与群および 592 mg/kg 以上を投与した各群で髄外造血が認められた。

腎臓では、455 および 769 mg/kg 投与群の雌雄で髄質に再生尿細管が、455 mg/kg 投与群の雄および 769 mg/kg 投与群の雌でリンパ球浸潤が観察されたほか、対照群の雌で皮髄境界部に鉍質沈着が認められた。

肺では、592 mg/kg 投与群の雄で軽微な好中球浸潤および軽度の泡沫細胞浸潤が認められ、対照群の雌で軽微な肺胞の出血が観察された。

脾臓では、対照群の雌を除く雌雄全群で髄外造血の増加が認められ、雄では対照群と比較して被験物質投与群で程度が強く、455 および 592 mg/kg 投与群では強度の増加となった。

胃では、769 mg/kg 投与群の雄で前胃の褐色色素沈着および腺胃の再生上皮が観察され、455 mg/kg 投与群の雌で腺胃の粘膜下織に好酸球浸潤が認められた。

【 考 察 】

N-フェニル-N'-イソプロピル-p-フェニレンジアミン（以下、PIPDと略）を 269、350、455、592、769 および 1000 mg/kg の用量で雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに単回経口投与し、以下のような結果を得た。

観察第 3 日から 5 日にかけて、雄では、269、350、455、592、769 および 1000 mg/kg 投与群でそれぞれ 5 例中 1、1、2、4、4 および 3 例が死亡し、雌では、592、769 および 1000 mg/kg 投与群でそれぞれ 5 例中 3、2 および 5 例が死亡した。

肝臓では、死亡例で肝細胞肥大および小葉中心性の肝細胞壊死ないし変性が観察され、生存例では、肝細胞の分裂像増加および小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。肝臓、特に小葉中心部は化学物質による毒性が発現しやすい部位⁸⁾であるが、肝臓の高い再生能より、損傷後は肝細胞が盛んに分裂して速やかに修復されることが知られている。以上のことから、PIPDを投与することにより肝障害が生じ、その後、生存例では回復に転じることが考えられた。この他、腎臓において、死亡例で、近位尿細管上皮の変性あるいは壊死がみられ、細胞片と考えられる顆粒状の円柱が観察されたほか、尿細管管腔の拡張が散見された。また、生存例では、数例で再生尿細管およびリンパ球浸潤が認められた。これら死亡例および生存例の尿細管における所見は、PIPD投与による腎障害を示唆するものであると考えられた。さらに、死亡例では肺の水腫および出血、前胃粘膜下組織の浮腫および出血が認められ、腹水および胸水の貯留も散見された。肝障害および腎障害時には、組織の浮腫および腹水などが生じるほか、肺の出血および粘膜下組織の出血が認められることが知られている⁹⁾。本試験は肝臓および腎臓の障害が示唆されたことから、浮腫および出血は、肝臓および腎臓の変化に起因する可能性が考えられた。

一般状態観察時に強い黄色調を示す尿が観察され、剖検では、死亡例で皮下組織の黄色化が散見されたことから、黄疸であることが推測され、黄疸の原因として、肝臓の障害像との関連が示唆された。また、一般状態観察時に多数例で皮膚色蒼白が観察され、死亡例では剖検時に脾臓の小型化および淡色化が認められたことから貧血が示唆されたが、死亡例の雌 2 例で脾臓の髄外造血が軽度増加し、生存例では皮膚色蒼白が数日で回復して雄で脾臓の髄外造血が増加したことから、黄疸の発現には溶血が関与した可能性も考えられた。なお、被験物質投与群で淡赤色ないし淡褐色尿が観察されたが、予備試験（試験計画番号A-00-063）およびPIPDの反復投与毒性試験（試験計画番号C-00-010）で認められた本

試験と同様の赤色ないし暗赤色尿は潜血反応が陰性であったこと、ならびに、ウサギおよびヒトでPIPDが尿中に排泄されるという報告がある^{10) - 12)} ことから、溶血に由来したものではなく、尿中に排泄されたPIPDの色調に由来する可能性が示唆された。

死亡例で、前胃のびらんならびに腺胃のびらんおよび粘膜の出血などが観察され、生存例でも、前胃の褐色色素沈着および腺胃の再生上皮などが認められた。胃粘膜上皮、特に前胃粘膜の損傷は、刺激性物質を投与することにより生じることが知られており¹³⁾、PIPDは、局所刺激性を有することが報告されていることから¹⁴⁾、今回観察された胃粘膜上皮の損傷の一因として、被験物質の刺激性が考えられた。

この他、雌雄とも各被験物質投与群で、体重減少ないし増加が抑制され、排便量が減少した。また、一般状態の変化として、うずくまり姿勢、閉眼および排便量の減少などが観察され、死亡例では、さらに、よろめき、流涙、腹臥位姿勢、呼吸数の減少、体表温低下などが観察されたが、本試験結果からは、これらが一般状態の悪化に伴うものであるのか、被験物質の直接作用によるものであるのかは判断できなかった。

以上の結果より算出したPIPDのLD₅₀は、雄で 522 mg/kg (95%信頼限界は 224 ~ 1154 mg/kg)、雌では 701 mg/kg であった。また、PIPD投与により肝臓および腎臓が障害され、肺胞水腫、胃粘膜の浮腫および前胃粘膜下織の出血、胸水および腹水の貯留、皮下組織の黄色化などが観察されることが明らかとなった。また、皮膚色蒼白および生存例の脾臓における髄外造血の増加から溶血性貧血が起きた可能性が示唆された。

【 参 考 文 献 】

- 1) 櫻本裕助: ラテックス製品における衛生性の問題点③. 高分子加工: 438-444 (1977)
- 2) 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠ら: 家庭用品による接触皮膚炎の原因化学物質の追求 (第1報). 衛生化学 28(3): 137-145 (1982)
- 3) Feinman, S. E.: Sensitivity to rubber chemicals. J. Toxicol.-Cut. & Ocular Toxicol. 6(2): 117-153(1987)
- 4) Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A.: Evaluation of contact sensitivity of rubber chemicals using the murine local lymph node assay. Contact Dermatitis 28: 77-80 (1993)
- 5) Momma, J., Kitajima, S., Inoue, T.: The guinea-pig skin sensitization test revisited: an evaluation formula to predict possible sensitization levels for eight chemicals used in household products. Toxicol. 126: 75-82 (1998)
- 6) Takahashi, A.: Problems of hygiene maintenance for food coming into contact with rubber and plastics products. Intern. Polymer Sci. & Technol. 3(1): T/93-T/105 (1976)
- 7) McCormick, W. E.: Environmental health control for the rubber industry, part II. Rubber Chem. & Technol. 45: 627-637 (1972)
- 8) Moslen, M. T.: Toxic responses of the liver in " Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons" 5th ed., Klassen, C. D. ads, McGraw-Hill Companies Inc. New York (1996) pp.403-416
- 9) 松澤佑次 編: 症候・病態の分子メカニズム, Molecular Med. 35 (1998)
- 10) 斉藤浩司, 宮崎勝巳, 有田隆一: Phenylisopropyl-p-phenylenediamine の体内動態. 薬学雑誌 100(2): 126-132 (1980)
- 11) Scansetti, G., Buglione, E., Massiccio, M. M., et al.: Excretion kinetics of the rubber anti-oxidant N-isopropyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine(IPPd). Int. Arch. Occup. Environ. Health 59: 537-543 (1987)
- 12) Scansetti, G., Buglione, E., Massiccio, M. M., et al.: Determinazione ambientale e biologica di N-isopropil-N'-fenil-p-fenilendiammina(IPPd) in un reparto di vulcanizzazione della gomma. Med. Lav. 74: 464-474 (1983)
- 13) 高橋道人 監訳: 「毒性病理学の基礎」, ソフトサイエンス社, 東京 (1992)
- 14) NIOSH: RTECS®, 2000-4: RTECS No. ST2650000 (2000)

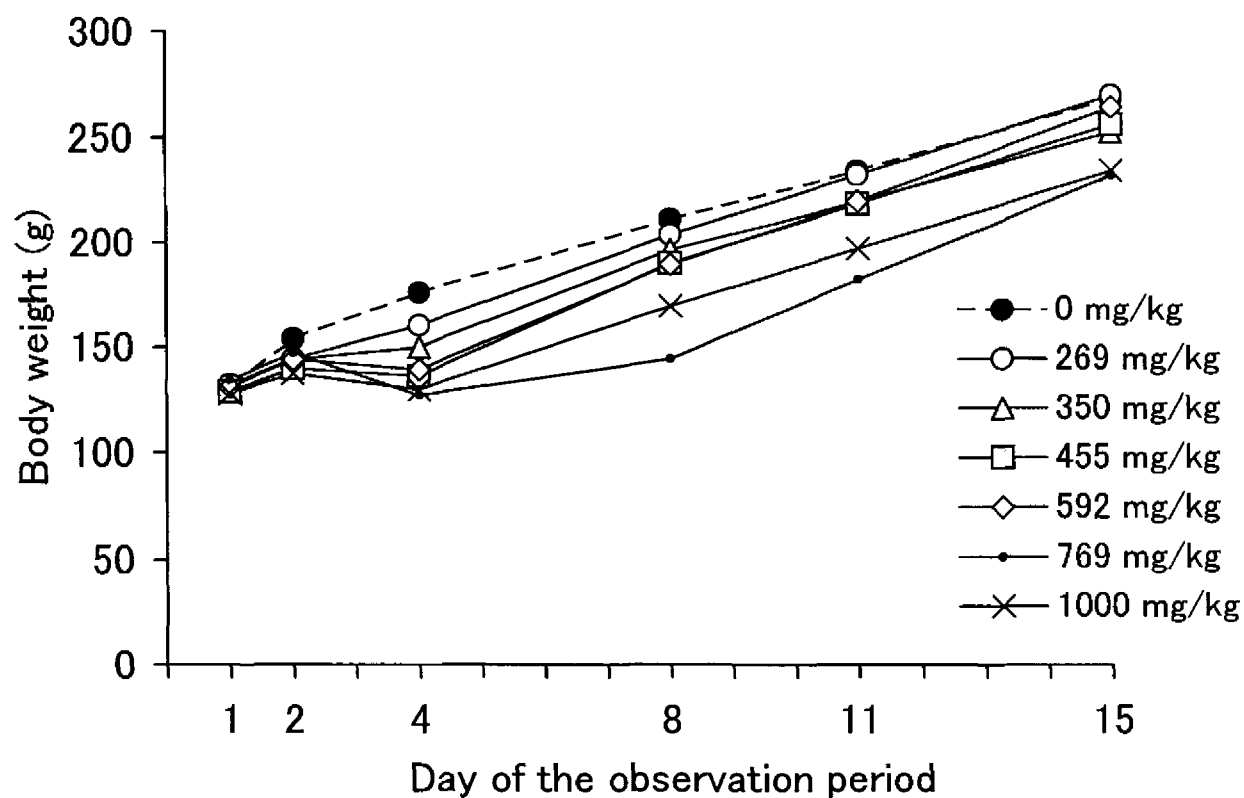


Fig. 1
Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats
Body weight changes in males

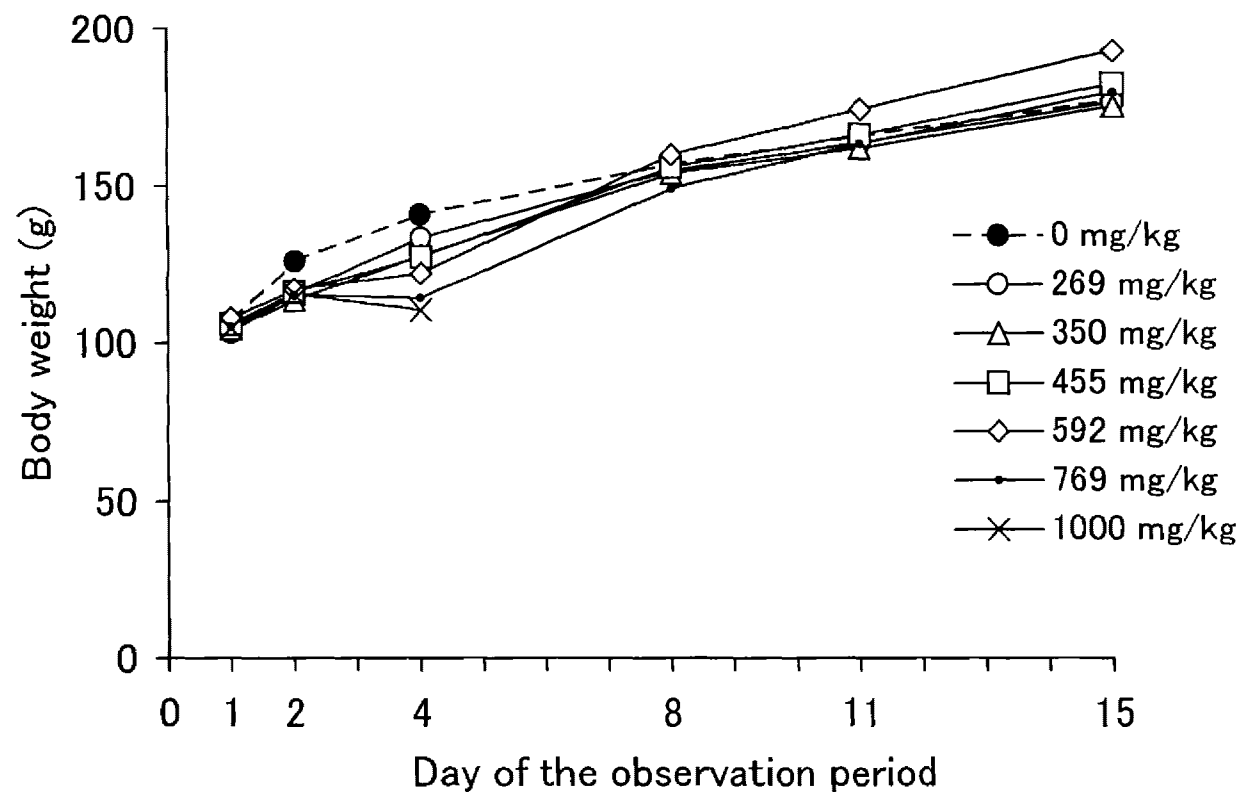


Fig. 2
Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats
Body weight changes in females

Clinical findings in males

a), initial number of animals was 5 per group; b), number of death at the time of gross observation is represented in parenthesis

Table 1-2
Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Clinical findings in females		Number of animals ^{a)} with clinical findings																					
Clinical findings	Dose (mg/kg)	Day of the observation period															Total						
		1	2	3	4	5	6	hrs	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11	12	13	14	15
Brownish urine	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	269	-	-	4	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	350	-	-	3	4	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	455	-	-	2	4	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	592	-	-	3	3	-	2	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	769	-	-	4	1	1	1	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	1000	-	-	2	4	3	4	5	1	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	5
Crouching position	0 - 269	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	350	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	455	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	592	-	-	-	1	2	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	769	-	-	-	1	2	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	1000	-	-	-	3	3	4	5	1	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	5
Eyelid closure	0 - 455	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	592	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	769	-	-	-	-	2	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	1000	-	-	-	3	2	3	5	1	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	5
Pale skin	0 - 269	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	350	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	455	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	592	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	769	-	-	-	-	-	-	5	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	1000	-	-	-	-	-	-	4	1	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	4
Yellowish urine	0 - 592	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1
	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
Abdominal distention	0 - 769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
Decrease of fecal volume	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	269	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	350	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	455	-	-	-	-	-	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	592	-	-	-	-	-	-	5	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	769	-	-	-	-	-	-	5	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	1000	-	-	-	-	-	-	5	1	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	5
Dyspnea	0 - 769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
Lacrimation	0 - 769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-	-	1	-	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
Prone position	0 - 769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-	-	1	-	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
Soiled fur	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	269	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	455	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	592	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	769	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
Hypothermia	0 - 769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-	-	1	-	-	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
Cumulative number of death	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	269	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	455	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	592	-	-	-	-	-	-	-	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	60
	769	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	40
	1000	-	-	-	-	-	-	-	4	(4)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
																						Lethality(%)	

Day 1, the day of administration; -, no animal showed the sign; ..., all animals died
a), initial number of animals was 5 per group; b), number of death at the time of gross observation is represented in parenthesis

Table 2-1
Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats
Body weight changes in males

Dose (mg/kg)	Animal No.	Day of the observation period					
		1	2	4	8	11	15
0	1	128.3	152.7	174.8	208.1	225.8	260.9
	2	132.8	155.3	180.7	213.8	242.3	277.8
	3	139.8	162.7	188.9	227.4	255.4	292.4
	4	124.3	144.5	164.1	195.0	215.1	246.9
	5	131.0	153.2	172.2	211.1	232.0	263.7
	Mean	131.2	153.7	176.1	211.1	234.1	268.3
	S.D.	5.8	6.5	9.3	11.6	15.5	17.4
269	T.S.D.	B→A	B→A→D	B→K→D	B→K	B→K	B→K
	6	135.0	149.1	162.5	207.7	236.6	274.3
	7	126.8	135.6	136.9	184.3	214.3	252.1
	8	132.6	144.7	Died -	- -	- -	- -
	9	137.8	152.9	174.2	217.3	247.6	285.5
	10	128.1	139.6	166.9	205.7	230.2	268.0
	Mean	132.1	144.4	160.1	203.8	232.2	270.0
350	S.D.	4.6	7.0	16.2	13.9	13.9	13.9
	T.S.D.	—	2.44	1.31	—	—	—
	11	132.4	140.8	134.6	Died -	- -	- -
	12	134.1	148.3	168.1	209.1	231.1	265.6
	13	129.7	140.5	151.4	195.4	214.1	246.5
	14	127.5	141.4	146.4	179.1	200.1	228.4
	15	136.5	150.0	148.2	203.1	232.3	269.4
455	Mean	132.0	144.2	149.7	196.7	219.4	252.5
	S.D.	3.5	4.6	12.1	13.0	15.3	18.9
	T.S.D.	—	2.49	2.09	—	—	—
	16	128.0	131.4	137.7	188.8	217.6	256.0
	17	127.0	138.3	133.1	188.0	214.2	250.0
	18	133.6	146.0	149.5	193.9	223.9	262.7
	19	128.8	143.7	Died -	- -	- -	- -
592	20	127.5	140.3	124.7	Died -	- -	- -
	Mean	129.0	139.9	136.3	190.2	218.6	256.2
	S.D.	2.7	5.6	10.3	3.2	4.9	6.4
	T.S.D.	—	3.61 **	3.11	—	—	—
	21	138.6	150.7	143.7	189.7	219.8	264.5
	22	125.9	136.5	Died -	- -	- -	- -
	23	129.5	148.5	146.9	Died -	- -	- -
769	24	136.9	150.8	Died -	- -	- -	- -
	25	123.9	134.7	127.1	Died -	- -	- -
	Mean	131.0	144.2	139.2	189.7	219.8	264.5
	S.D.	6.5	8.0	10.6			
	T.S.D.	—	2.48	2.69	NP	NP	NP
	26	133.2	146.0	126.9	144.4	182.3	232.3
	27	137.5	153.6	Died -	- -	- -	- -
1000	28	130.2	142.8	Died -	- -	- -	- -
	29	133.6	142.2	Died -	- -	- -	- -
	30	136.4	150.7	Died -	- -	- -	- -
	Mean	134.2	147.1	126.9	144.4	182.3	232.3
	S.D.	2.9	5.0				
	T.S.D.	—	1.74	NP	NP	NP	NP
	31	121.6	132.1	124.6	165.1	188.6	226.4
1000	32	129.4	133.7	Died -	- -	- -	- -
	33	131.2	142.7	135.1	174.1	205.8	242.2
	34	125.0	136.7	Died -	- -	- -	- -
	35	133.4	141.6	Died -	- -	- -	- -
	Mean	128.1	137.4	129.9	169.6	197.2	234.3
	S.D.	4.8	4.7				
	T.S.D.	—	4.29 **	NP	NP	NP	NP

Parameter, body weight(g); **, significantly different from control, $p < 0.01$
T.S.D., test of significantly different; B, Bartlett's test; A, analysis of variance
K, Kruskal-Wallis' h test; D, Dunnett's or Dunnett type mean rank test
Value in T.S.D., statistic of multiple comparisons test; NP, T.S.D. was not performed

Table 2-2

Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Body weight changes in females

Dose (mg/kg)	Animal No.	Day of the observation period					
		1	2	4	8	11	15
0	36	107.2	125.6	140.7	149.9	154.9	162.3
	37	102.9	120.6	133.4	149.6	159.6	172.6
	38	103.2	121.5	136.8	152.3	158.6	169.9
	39	113.2	132.9	147.8	168.9	180.0	193.4
	40	107.1	129.0	145.3	164.4	176.6	187.8
	Mean	106.7	125.9	140.8	157.0	165.9	177.2
	S.D.	4.2	5.2	5.9	9.0	11.5	13.0
	T.S.D.	B→A	B→A	B→K→D	B→K	B→K	B→K
269	41	96.1	109.7	125.4	144.5	155.3	167.1
	42	108.1	106.8	129.8	162.6	177.4	196.0
	43	101.8	122.6	135.2	149.6	153.3	161.6
	44	99.0	115.5	132.4	149.7	155.9	165.1
	45	111.2	123.0	144.2	167.3	177.8	192.5
	Mean	103.2	115.5	133.4	154.7	163.9	176.5
	S.D.	6.3	7.3	7.0	9.7	12.5	16.4
	T.S.D.	—	—	1.17	—	—	—
350	46	103.7	120.7	134.8	159.5	168.0	185.5
	47	101.1	102.4	119.8	148.7	159.6	177.1
	48	112.6	117.0	134.5	166.6	177.4	192.6
	49	103.6	112.3	120.9	150.8	159.2	170.4
	50	101.2	114.1	128.0	144.6	146.5	151.0
	Mean	104.4	113.3	127.6	154.0	162.1	175.3
	S.D.	4.7	6.9	7.2	8.9	11.5	16.0
	T.S.D.	—	—	2.00	—	—	—
455	51	109.5	127.4	144.4	169.7	185.1	206.3
	52	104.6	114.2	123.1	155.7	167.1	179.5
	53	102.8	110.2	117.0	145.0	157.3	173.3
	54	108.0	114.6	127.9	154.6	162.0	173.6
	55	103.9	113.3	123.4	154.4	160.2	179.5
	Mean	105.8	115.9	127.2	155.9	166.3	182.4
	S.D.	2.9	6.6	10.4	8.8	11.1	13.7
	T.S.D.	—	—	2.19	—	—	—
592	56	102.3	114.7	Died —	—	—	—
	57	113.5	125.4	126.4	167.9	181.7	201.0
	58	107.4	112.0	117.8	152.3	167.0	184.8
	59	104.4	115.1	Died —	—	—	—
	60	110.2	117.7	Died —	—	—	—
	Mean	107.6	117.0	122.1	160.1	174.4	192.9
	S.D.	4.5	5.1	—	—	—	—
	T.S.D.	—	—	NP	NP	NP	NP
769	61	104.5	116.1	108.2	146.9	159.2	178.6
	62	101.9	113.9	Died —	—	—	—
	63	108.1	120.7	117.5	147.9	167.7	184.9
	64	106.5	120.2	116.9	152.4	163.4	175.6
	65	104.0	105.0	Died —	—	—	—
	Mean	105.0	115.2	114.2	149.1	163.4	179.7
	S.D.	2.4	6.4	5.2	2.9	4.3	4.7
	T.S.D.	—	—	3.4	—	—	—
1000	66	103.4	112.7	Died —	—	—	—
	67	106.4	117.8	Died —	—	—	—
	68	104.1	119.3	Died —	—	—	—
	69	109.2	113.0	110.4	Died —	—	—
	70	99.8	113.8	Died —	—	—	—
	Mean	104.6	115.3	110.4	—	—	—
	S.D.	3.5	3.0	—	—	—	—
	T.S.D.	—	—	NP	—	—	—

Parameter, body weight(g)

T.S.D., test of significantly different; B, Bartlett's test; A, analysis of variance

K, Kruskal-Wallis' h test; D, Dunnett's or Dunnett type mean rank test

Value in T.S.D., statistic of multiple comparisons test; NP, T.S.D. was not performed

Table 3-1

Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Sectional gain of body weight in males

Dose (mg/kg)	Animal No.	Day of the observation period				
		1-2	2-4	4-8	8-11	11-15
0	1	24.4	22.1	33.3	17.7	35.1
	2	22.5	25.4	33.1	28.5	35.5
	3	22.9	26.2	38.5	28.0	37.0
	4	20.2	19.6	30.9	20.1	31.8
	5	22.2	19.0	38.9	20.9	31.7
	Mean	22.4	22.5	34.9	23.0	34.2
	S.D.	1.5	3.3	3.6	4.9	2.4
269	6	14.1	13.4	45.2	28.9	37.7
	7	8.8	1.3	47.4	30.0	37.8
	8	12.1	Died			
	9	15.1	21.3	43.1	30.3	37.9
	10	11.5	27.3	38.8	24.5	37.8
	Mean	12.3	15.8	43.6	28.4	37.8
	S.D.	2.4	11.2	3.7	2.7	0.1
350	11	8.4	-6.2	Died		
	12	14.2	19.8	41.0	22.0	34.5
	13	10.8	10.9	44.0	18.7	32.4
	14	13.9	5.0	32.7	21.0	28.3
	15	13.5	-1.8	54.9	29.2	37.1
	Mean	12.2	5.5	43.2	22.7	33.1
	S.D.	2.5	10.3	9.2	4.5	3.7
455	16	3.4	6.3	51.1	28.8	38.4
	17	11.3	-5.2	54.9	26.2	35.8
	18	12.4	3.5	44.4	30.0	38.8
	19	14.9	Died			
	20	12.8	-15.6	Died		
	Mean	11.0	-2.8	50.1	28.3	37.7
	S.D.	4.4	9.9	5.3	1.9	1.6
592	21	12.1	-7.0	46.0	30.1	44.7
	22	10.6	Died			
	23	19.0	-1.6	Died		
	24	13.9	Died			
	25	10.8	-7.6	Died		
	Mean	13.3	-5.4	46.0	30.1	44.7
	S.D.	3.5	3.3			
769	26	12.8	-19.1	17.5	37.9	50.0
	27	16.1	Died			
	28	12.6	Died			
	29	8.6	Died			
	30	14.3	Died			
	Mean	12.9	-19.1	17.5	37.9	50.0
	S.D.	2.8				
1000	31	10.5	-7.5	40.5	23.5	37.8
	32	4.3	Died			
	33	11.5	-7.6	39.0	31.7	36.4
	34	11.7	Died			
	35	8.2	Died			
	Mean	9.2	-7.6	39.8	27.6	37.1
	S.D.	3.1				

Parameter, sectional gain of body weight(g)

Table 3-2

Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Sectional gain of body weight in females

Dose (mg/kg)	Animal No.	Day of the observation period				
		1-2	2-4	4-8	8-11	11-15
0	36	18.4	15.1	9.2	5.0	7.4
	37	17.7	12.8	16.2	10.0	13.0
	38	18.3	15.3	15.5	6.3	11.3
	39	19.7	14.9	21.1	11.1	13.4
	40	21.9	16.3	19.1	12.2	11.2
	Mean	19.2	14.9	16.2	8.9	11.3
	S.D.	1.7	1.3	4.5	3.1	2.4
269	41	13.6	15.7	19.1	10.8	11.8
	42	-1.3	23.0	32.8	14.8	18.6
	43	20.8	12.6	14.4	3.7	8.3
	44	16.5	16.9	17.3	6.2	9.2
	45	11.8	21.2	23.1	10.5	14.7
	Mean	12.3	17.9	21.3	9.2	12.5
	S.D.	8.3	4.2	7.1	4.3	4.2
350	46	17.0	14.1	24.7	8.5	17.5
	47	1.3	17.4	28.9	10.9	17.5
	48	4.4	17.5	32.1	10.8	15.2
	49	8.7	8.6	29.9	8.4	11.2
	50	12.9	13.9	16.6	1.9	4.5
	Mean	8.9	14.3	26.4	8.1	13.2
	S.D.	6.3	3.6	6.1	3.7	5.5
455	51	17.9	17.0	25.3	15.4	21.2
	52	9.6	8.9	32.6	11.4	12.4
	53	7.4	6.8	28.0	12.3	16.0
	54	6.6	13.3	26.7	7.4	11.6
	55	9.4	10.1	31.0	5.8	19.3
	Mean	10.2	11.2	28.7	10.5	16.1
	S.D.	4.5	4.0	3.0	3.9	4.2
592	56	12.4	Died			
	57	11.9	1.0	41.5	13.8	19.3
	58	4.6	5.8	34.5	14.7	17.8
	59	10.7	Died			
	60	7.5	Died			
	Mean	9.4	3.4	38.0	14.3	18.6
	S.D.	3.3				
769	61	11.6	-7.9	38.7	12.3	19.4
	62	12.0	Died			
	63	12.6	-3.2	30.4	19.8	17.2
	64	13.7	-3.3	35.5	11.0	12.2
	65	1.0	Died			
	Mean	10.2	-4.8	34.9	14.4	16.3
	S.D.	5.2	2.7	4.2	4.8	3.7
1000	66	9.3	Died			
	67	11.4	Died			
	68	15.2	Died			
	69	3.8	-2.6	Died		
	70	14.0	Died			
	Mean	10.7	-2.6			
	S.D.	4.5				

Parameter, sectional gain of body weight(g)

Table 4-1-1

Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Macroscopic findings of died males during observation period

Group	269 mg/kg	350 mg/kg	455 mg/kg		592 mg/kg				769 mg/kg				1000 mg/kg		
Animal No.	8	11	19	20	22	23	24	25	27	28	29	30	32	34	35
Day of autopsy	3	4	3	4	4	5	3	4	3	4	3	3	3	3	4
(Subcutis)															
Yellowish	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+
(Thoracic cavity)															
Pleural effusion, reddish/dark red/bloody	—	+	+	—	+	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—
Pleural effusion, watery clear	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
(Abdominal cavity)															
Ascites, reddish/dark red/bloody	—	+	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
(Forestomach)															
Area, detachment, mucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	—
Spot/area, dark/dark red/red, mucosa	—	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
Area, indentation, mucosa	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Pale, mucosa	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(Glandular stomach)															
Pale, mucosa	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+
Thickening, mucosa	+	—	—	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+	—	+
Area, indentation, mucosa	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—
Spot/area, dark/dark red/red, mucosa	—	+	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+
(Lung)															
Edematous	—	+	+	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—
Spot/area, dark red	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
(Liver)															
Enlargement	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+
(Spleen)															
Small	—	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+
Pale	—	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+
(Kidney)															
Enlargement	—	—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	+

—, negative; +, positive.

Table 4-1-2

Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Macroscopic findings of died females during observation period

Group	592 mg/kg			769 mg/kg		1000 mg/kg				
Animal No.	56	59	60	62	65	66	67	68	69	70
Day of autopsy	3	4	3	3	4	3	3	3	4	3
(Subcutis)										
Yellowish	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
(Thoracic cavity)										
Pleural effusion, watery clear	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
(Abdominal cavity)										
Ascites, dark red	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Ascites, watery clear	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
(Forestomach)										
Area, detachment, mucosa	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
Spot/area, dark/dark red/red, mucosa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
(Glandular stomach)										
Pale, mucosa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Thickening, mucosa	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
Area, indentation, mucosa	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Spot/area, dark/dark red, mucosa	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
(Lung)										
Edematous	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dark red	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
(Liver)										
Enlargement	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
(Spleen)										
Small	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Pale	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
(Kidney)										
Enlargement	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Pale	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

-, negative; +, positive.

Table 4-2-1

Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Macroscopic findings in males at the end of the observation period

Group	0 mg/kg					269 mg/kg				350 mg/kg				455 mg/kg			592 mg/kg	769 mg/kg	1000 mg/kg	
Animal No.	1	2	3	4	5	6	7	9	10	12	13	14	15	16	17	18	21	26	31	33
(Forestomach)																				
Thickening, mucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Pale, mucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

-, negative; +, positive.

Table 4-2-2

Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Macroscopic findings in females at the end of the observation period

Group	0 mg/kg					269 mg/kg					350 mg/kg					455 mg/kg					592 mg/kg		769 mg/kg		
Animal No.	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	57	58	61	63	64
(Forestomach)																									
Thickening, mucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Pale, mucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+

-, negative; +, positive.

Table 5-1-1

Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Histopathologic findings of died males during observation period

Group	269 mg/kg	350 mg/kg	455 mg/kg		592 mg/kg				769 mg/kg				1000 mg/kg		
Animal No.	8	11	19	20	22	23	24	25	27	28	29	30	32	34	35
Day of autopsy	3	4	3	4	4	5	3	4	3	4	3	3	3	3	4
(Forestomach)															
Erosion	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Degeneration, vacuolar, epithelium	-	+	+	±	±	+	+	++	+	-	-	-	+	-	+
Hemorrhage, submucosa	-	+	+	-	-	±	±	++	+	++	++	+	+	+	+
Edema, submucosa	±	++	+	-	-	±	-	++	++	++	++	-	+	+	-
Cellular infiltration, neutrophil	-	+	+	±	-	-	±	+	+	+	+	±	+	+	+
(Glandular stomach)															
Erosion	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Hemorrhage, mucosa	±	±	-	-	-	±	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Edema, submucosa	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellular infiltration, neutrophil	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
(Lung)															
Edema, alveolar	-	+	++	-	++	++	++	++	+	++	+++	+++	+	+++	+++
Hemorrhage, alveolar	±	+	-	-	++	+	+	-	+	-	-	+	-	-	±
Cellular infiltration, foam cell	-	-	-	±	++	+	±	±	-	-	-	-	-	-	±
(Liver)															
Necrosis / degeneration, hepatocyte, centrilobular	±	±	±	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
Hypertrophy, hepatocyte	±	++	-	++	++	++	+	+	-	+	-	-	-	-	++
(Spleen)															
Atrophy	+	++	++	++	+++	+++	++	++	++	+++	++	+	++	++	++
(Kidney)															
Necrosis / degeneration, tubular epithelium, proximal	++	-	+	-	++	-	++	++	±	++	++	++	++	++	++
Cast, granular, proximal tubule	-	-	-	-	++	++	-	++	+	++	++	++	++	++	++

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

Table 5-1-2
Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Histopathologic findings of died females during observation period

Group	592 mg/kg			769 mg/kg		1000 mg/kg				
Animal No.	56	59	60	62	65	66	67	68	69	70
Day of autopsy	3	4	3	3	4	3	3	3	4	3
(Forestomach)										
Erosion	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+
Degeneration, vacuolar, epithelium	—	—	—	—	+	—	—	—	±	—
Hemorrhage, submucosa	+	++	+	++	—	+	++	+	+	++
Edema, submucosa	—	++	±	++	—	+	+	+	+	++
Cellular infiltration, neutrophil	+	++	±	++	±	++	+	+	++	++
(Glandular stomach)										
Erosion	+	—	—	—	—	+	+	—	+	+
Hemorrhage, mucosa	—	—	—	±	±	—	+	—	+	—
(Lung)										
Edema, alveolar	++	+++	+	++	++	+	+	++	+	++
Hemorrhage, alveolar	+	—	+	+	—	±	—	—	±	+
Cellular infiltration, foam cell	±	±	±	±	+	+	±	—	±	—
Cellular infiltration, neutrophil	—	—	+	—	±	—	—	—	+	—
(Liver)										
Necrosis / degeneration, hepatocyte, centrilobular	+	+	—	—	+	±	+	+	+	+
Hypertrophy, hepatocyte	+	++	++	++	++	—	++	++	++	++
(Spleen)										
Atrophy	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
Hematopoiesis, extramedullary	—	—	—	—	—	++	+	—	—	—
(Kidney)										
Necrosis / degeneration, tubular epithelium, proximal	+	—	—	+	—	—	+	+	+	+
Cast, granular, proximal tubule	++	+	±	++	—	—	++	++	+	+
Dilatation, distal tubule	—	—	—	—	—	±	+	+	+	—

—, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

Table 5-2-1

Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Histopathologic findings in males at the end of the observation period

Group Animal No.	0 mg/kg 1	269 mg/kg 6	350 mg/kg 12	455 mg/kg 16	592 mg/kg 21	769 mg/kg 26	1000 mg/kg 31
(Forestomach)							
Deposit, pigment, brown	—	—	—	—	—	±	—
(Glandular stomach)							
Regeneration, epithelium	—	—	—	—	—	±	—
(Lung)							
Cellular infiltration, foam cell	—	—	—	—	+	—	—
Cellular infiltration, neutrophil	—	—	—	—	±	—	—
(Liver)							
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	—	—	—	±	+	+	+
Increased mitosis, hepatocyte	—	—	—	—	—	±	±
Hematopoiesis, extramedullary	—	—	—	±	±	±	±
(Spleen)							
Hematopoiesis, extramedullary	+	++	++	+++	+++	++	++
(Kidney)							
Regeneration, tubular epithelium, medulla	—	—	—	+	—	±	—
Cellular infiltration, lymphocyte	—	—	—	±	—	—	—

—, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

Table 5-2-2
Acute oral toxicity test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Histopathologic findings in females at the end of the observation period

Group Animal No.	0 mg/kg 36	269 mg/kg 41	350 mg/kg 46	455 mg/kg 51	592 mg/kg 57	769 mg/kg 61
(Forestomach)						
Abnormality	—	—	—	—	—	—
(Glandular stomach)						
Cellular infiltration, eosinophil, submucosa	—	—	—	±	—	—
(Lung)						
Hemorrhage, alveolar	±	—	—	—	—	—
(Liver)						
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	—	—	—	—	—	±
Hematopoiesis, extramedullary	±	—	±	—	±	±
(Spleen)						
Hematopoiesis, extramedullary	—	±	±	±	±	±
(Kidney)						
Regeneration, tubular epithelium, medulla	—	—	—	±	—	±
Cellular infiltration, lymphocyte	—	—	—	—	—	±
Mineralization, cortico-medullary junction	±	—	—	—	—	—

—, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.