

067-11

食薬セ研第12-1892号

2002年 7月12日

N-フェニル-*N'*-イソプロピル-
p-フェニレンジアミンの
ラットを用いる28日間反復経口投与
毒性試験（回復14日間）

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	3
試験方法	4
1. 被験物質	4
2. 使用動物および飼育方法	4
3. 投与検体	5
4. 群および群分け	5
5. 投与方法	6
6. 観察および検査	6
7. データの解析	10
結果	12
1. 死亡例	12
2. 一般状態	12
3. 体重	12
4. 摂餌量	12
5. 摂水量	13
6. 尿検査	13
7. 血液学検査	13
8. 血液生化学検査	14
9. 病理学検査	15
考察	18
参考文献	21
Fig. 1、2	22
Table 1~12	25

【要 約】

N-フェニル-N'-イソプロピル-*o*-フェニレンジアミン（以下、PIPDと略）の28日間反復経口投与毒性試験（回復14日間）を雌雄の Sprague-Dawley 系ラットを用いて実施した。雌雄とも 10、30 および 100 mg/kg の用量でPIPDを投与する被験物質投与群ならびに媒体である 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4群を設定し、28日間、反復強制経口投与を行った。試験には各群5匹ならびに対照群および 100 mg/kg 投与群の回復試験用各5匹を加えた計60匹の動物を使用した。

死亡例はなく、100 mg/kg 投与群では流涎および淡褐色尿、雄で緑色調の便が観察され、投与第1日から2日にかけて摂餌量が減少し、体重減少ないし増加が抑制された。流涎は 30 mg/kg 投与群の一部でも観察された。

尿検査では、10 mg/kg 投与群の雌および 30 mg/kg 以上の投与群でビリルビンが陽性となった。また、30 mg/kg 投与群の雄および 100 mg/kg 投与群の一部で尿蛋白が中等度以上検出された他、尿が黄色から褐色を呈した。尿蛋白は回復第2週の検査でも 100 mg/kg 投与群の雌雄で中等度以上の個体が散見された。

血液学検査では、100 mg/kg 投与群の雌雄で、赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値が低下し、網状赤血球比率および血小板数が増加したほか、白血球分類において、リンパ球比率が低下して好中球比率が上昇した。また、30 および 100 mg/kg 投与群の雄で平均赤血球容積が減少した。骨髓像では、30 および 100 mg/kg 投与群の雌で顆粒球系の骨髓球の比率が増加し、100 mg/kg 投与群でリンパ球比率が低下した。また、30 mg/kg 投与群の雌で巨核球比率が上昇した。100 mg/kg 投与群では、2週間の回復試験終了後も血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量が減少し、血小板数および網状赤血球比率が上昇したほか、骨髓像では、M/E 比の減少を伴って血芽球系細胞比率が上昇した。

血液生化学検査では、10 および 30 mg/kg 投与群の雌および 100 mg/kg 投与群の雌雄で総蛋白濃度が上昇し、30 および 100 mg/kg 投与群の雌ではアルブミン濃度も上昇した。また、100 mg/kg 投与群では、総コレステロール濃度およびカルシウム濃度が上昇し、雄で総ビリルビン濃度が上昇したほか、回復試験後も総蛋白濃度およびカルシウム濃度が上昇し、雌で尿素窒素濃度、総コレステロール濃度およびトリグリセライド濃度が上昇した。

病理学的に 100 mg/kg 投与群では、肝臓重量の増加、肝臓の腫大、好酸性肝細胞肥大、小葉中間帯の脂肪化が認められ、軽微な肝細胞の単細胞壊死が多数例に観察されたほか、脾臓重量の増加、脾臓の腫大、ヘモジデリン沈着および髄外造血増加の増強が認められた。また、同群では、腎臓重量の増加、雄で好塩基性尿細管の増強および軽微なヘモジデリン沈着が散見され、前胃粘膜では、雌雄各 1 例で剖検時に肥厚が観察された。30 mg/kg 投与群でも肝臓重量の増加、肝臓の腫大、好酸性肝細胞肥大が認められ、雄で小葉中間帯の脂肪化が、雌で脾臓のヘモジデリン沈着の増強が確認された。回復試験終了後、肝臓重量の増加、好酸性肝細胞肥大および小葉中間帯の脂肪化は軽減したが、肝細胞の単細胞壊死は多数例で認められ、脾臓の腫大ならびに髄外造血の増加およびヘモジデリン沈着の増強も観察された。また、雄では、脾臓重量および腎臓重量が増加し、腎臓の腫大、好塩基性尿細管出現の増強が認められた。

以上の結果、本試験条件下における PIPD の無作用量は、雄で 10 mg/kg、雌では 10 mg/kg 未満であると考えられた。また、PIPD の標的器官は肝臓、血液、腎臓であることが示唆され、主として肝重量の増加を伴う好酸性肝細胞肥大、小葉中間帯の脂肪化および肝細胞の単細胞壊死、溶血性貧血、腎臓重量の増加および尿蛋白の上昇が生じることが明らかとなった。これらの変化の中で、肝細胞の単細胞壊死は、2 週間の投与中止後も回復しなかったが、その他の変化は軽減し、回復過程にあると考えられた。

【緒 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製品のみならず、PIPD単独でも人体に対するパッチテストで感作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)}。しかし、反復投与した場合の毒性に関する報告はほとんどなく、その用途からも長期暴露についての検討が必要である。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の安全性を確認するために、ラットにおける28日間反復経口投与毒性試験を実施したのでその結果を報告する。

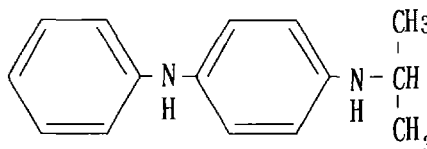
本試験は、化審法『「新規化学物質に係る試験の方法について」の一部改正等について（スクリーニング毒性試験法の制定）—ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験—』（昭和61年12月5日、環保業第700号、薬発第1039号、61基局第1014号：以下、化審法ガイドライン）および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号、平成12年3月1日改正、環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号）に準拠して実施した。

【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 30 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(株)) と水道水 (秦野市水道局給水) を自由に摂取 (但し、解剖前約 18~24 時間は絶食) させて飼育

(注 1) 動物入荷日: 2001年6月11日 入荷匹数: 雄34匹 雌34匹
入荷時体重: 雄 68.8~82.1 g (平均 77.2 g)
雌 65.4~76.4 g (平均 71.1 g)
投与日: 2001年6月19日
投与時体重: 雄 145.7~166.8 g (平均 154.5 g)
雌 124.0~149.6 g (平均 135.3 g)

(注 2) 動物飼育期間中における温湿度の実測値
温度 23.5~25.0℃ 湿度 56~68%

した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿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、耳パンチにより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。

被験物質の急性経口毒性試験（秦野研究所で実施、試験計画番号：A-00-064）において安定性試験を実施し、0.10、2.00 および 10.0 w/v%に調製した投与検体について、冷蔵所条件下（冷蔵庫内）における 8 日間の安定性を確認したため（Appendix A）、週 1 回の頻度で投与検体を調製し、使用時まで冷蔵庫にて保管した。また、初回調製時の、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 98.2 ~ 109%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 C-00-009）の結果を基に決定した。即ち、0、10、100、200 および 300 mg/kg の用量で雌雄動物に 7 日間反復経口投与した結果、投与第 3 日に 300 mg/kg 投与群の雄 1 例が死亡した。一般状態観察では、200 mg/kg 投与群の雌雄で淡褐色尿がみられ、同群の雄でうずくまり姿勢が認められた。300 mg/kg 投与群では雌雄で、この淡褐色尿およびうずくまり姿勢の他に、閉眼、よろめき、散瞳および皮膚色蒼白等が観察された。また、200 および 300 mg/kg

投与群の雌雄で、体重が増加抑制ないし減少した。これらの変化は、淡褐色尿、300 mg/kg 投与群の雌 1 例の皮膚色蒼白および 300 mg/kg 投与群の雄の体重減少を除き、投与第 7 日までには回復する傾向にあった。剖検では、100 mg/kg 以上の用量を投与した群で、肝臓の腫大が認められ、200 および 300 mg/kg 投与群では、前胃粘膜の肥厚、浮腫および白濁等も散見された。この他、被験物質の急性経口毒性試験⁸⁾において、269 mg/kg 投与群の雄 5 例中 1 例が死亡した。これらの結果から、100 mg/kg は被験物質の毒性変化が現れ、且つ、28日間の連投に耐えうる用量であると判断し、本試験の投与用量は 100 mg/kg を高用量とし、以下、公比約 3 で除して 30 および 10 mg/kg を中および低用量に設定した。

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	投与量 (mg/kg)	濃 度 (w/v %)	投与容量 (mL/kg)	動物番号		剖検時期*
					雄	雌	
対 照	0.5%CMC Na	0	0	10	1～5 6～10	31～35 36～40	回復 投与
低用量	PIPD	10	0.1	10	11～15	41～45	投与
中用量	PIPD	30	0.3	10	16～20	46～50	投与
高用量	PIPD	100	1.0	10	21～25 26～30	51～55 56～60	回復 投与

* 剖検時期は以下の通りとした。

回復：投与期間終了後は回復試験に用い、回復試験期間終了時に定期解剖を行った。
投与：投与期間終了時に定期解剖を行った。

5. 投与方法

投与時刻は 9 時から 12 時の間とし、1 日 1 回、28 日間計 28 回、ラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。投与容量は 10 mL/kg とし、投与液量は各投与時の最近時の体重を基に個体別に算出した。また、投与経路および方法ならびに投与回数は、化審法ガイドラインに従って決定した。なお、投与期間中の日数および週の表記法は、投与開始日および投与開始週をそれぞれ投与第 1 日および投与第 1 週とし、回復試験期間中の日数および週の表記法もこれに準じて回復試験第 1 日および回復試験第 1 週とした。

6. 観察および検査

1) 一般検査

毎日（投与期間中は少なくとも投与前および投与後約 1 時間、回復試験期間中は 1 日

1回)、全例の生死を含む一般状態の観察を行った。また、投与第1週では毎日、投与第2週以降は、1週1回(各週の第4日)の頻度で、投与後約1時間の症状観察時に全例を1匹ずつケージから取り出して歩行異常および散瞳の有無を観察した。

体重は、投与第1週では、投与第1(投与初日)、第2および第4日に測定し、以後回復試験第2週まで毎週2回の頻度で、それぞれの週の第1日と第4日に測定したほか、投与期間終了日(投与第28日)、回復試験期間終了日(回復試験第14日)および剖検日にも測定した。なお、投与期間中の体重は、いずれも当日の投与前に測定した。また、投与第1週には、投与第1日から2日にかけて1日あたりの摂餌量を測定し、以後回復試験第2週まで毎週1回の頻度で、それぞれの週の第1日から第2日にかけての1日あたりの摂餌量を測定した。さらに、投与第4週および回復試験第2週の尿検査時に、代謝ケージ内での1日あたりの摂水量を測定した。

2)尿検査

投与第4週および回復試験第2週に全例を約24時間代謝ケージに収容し、以下の項目について検査した。ただし、4時間尿あるいは新鮮尿については、試験紙による検査、沈渣および色調・濁度の観察を実施し、約24時間の蓄尿については尿量および比重の検査に加えて、第4週では確認のために色調を観察した。また、投与第1週に全例を約4時間代謝ケージに収容し、試験紙による検査、沈渣および色調・濁度について検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
色調・混濁度	視診	
尿量	計量	天秤
比重	重量法	同上
pH・蛋白質・糖・ケトン体	試験紙法	クリテック 200+ (バイエル・三共)
ビリルビン・潜血・ウロビリノーゲン	同上	同上
沈渣	鏡検	光学顕微鏡

なお、予備試験において、尿の色調が試験紙による検査結果に影響を与えている可能性が否定できなかったため、試験紙による検査のうち、pH、糖、ビリルビンおよび潜血について以下の方法で反応を確認した。

項 目	対象動物	確 認 方 法
pH	全例	pHメーター (pH BOY-P2、新電元工業)
ビリルビン	全例	尿中ビリルビン検査用試薬 (イクトテスト、バイエル・三共)
糖・潜血	陽性例	測定時に目視により試験紙の発色を確認

3) 採血

ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、定期解剖例全例の腹部後大静脈から①～③の順序で、可能な限り対照群から低、中、高用量群の順に各群動物番号の若いほうから1匹ずつ選抜して採血した。

①血液学検査用採血（抗凝固剤：クエン酸ナトリウム）

②血液学検査用採血（抗凝固剤：EDTA-3K）

③血液生化学検査用採血（抗凝固剤：ヘパリン）

4) 血液学検査

3) 採血の項②で採取した全例の血液を用い、以下の項目について検査した。ただし、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間は、3) 採血の項①で採取した血液から血漿を分離して測定した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
赤血球数(RBC)	電気抵抗法	血液自動分析装置 CELL-DYN3500SL(ダイボット)
白血球数(WBC)	フローサイトメリー・レーザー光散乱法/電気抵抗法	同上
白血球分類	フローサイトメリー・レーザー光散乱法 ^{a)}	同上
血色素量(Hb)	吸光度法	同上
平均赤血球容積(MCV)	電気抵抗法	同上
血小板数	電気抵抗法	同上
ハトクリット値(Ht)	計算 (RBC×MCV×0.001)	同上
平均赤血球血色素量(MCH)	計算 (Hb×1000/RBC)	同上
平均赤血球血色素濃度(MCHC)	計算 (Hb×100/Ht)	同上
網状赤血球比率 ^{b)}	Brecher 法	光学顕微鏡
骨髓像検査 ^{b)}	鏡検(骨髓塗抹標本)	同上
プロトロンビン時間(PT)	光散乱検出法	全自動血液凝固測定装置 CA-1000(東亜医用電子)
活性部分トロンボプラスチン時間(APTT)	同上	同上

a) 白血球分類の補助としては、静脈血塗抹標本(Wright-Giemsa 染色)を作製したが、結果は採用しなかった。

b) 採血時に全例の網状赤血球標本および骨髓塗抹標本を作成し、まず、投与期間終了時の対照群および高用量群の雌雄全例について検査した。その結果、被験物質投与に起因した変化が疑われたため、回復試験を含む全例について検査した。

5) 血液生化学検査

3) 採血の項③で採取した全例の血液から血漿を分離し、次頁の項目について検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
総蛋白濃度	ビレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
アルブミン濃度	BCG 法	同上
総コレステロール濃度	COD-DAOS 法	同上
ブドウ糖濃度	グルコキナーゼ G6PDH 法	同上
尿素窒素濃度 (BUN)	ウレアゼ G.O. DH 法	同上
クレアチン濃度	Jaffé 法 (Rate)	同上
ALP 活性	GSCC 法	同上
GOT (AST) 活性	IFCC 法	同上
GPT (ALT) 活性	同上	同上
γ-GTP活性	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法	同上
トリグリセリド濃度	GPO・DAOS 法	同上
総ビリルビン濃度	Jendrassik/Grof 法	同上
無機リン濃度 (Inorg. phos.)	モリブデン酸直接法	同上
カルシウム濃度	OCPC 法	同上
A/G 比	計算	
ナトリウム濃度	イオン電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)
カリウム濃度	同上	同上
塩素濃度	同上	同上

6) 病理学検査

全例の3) 項の採血後、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺し、剖検して器官・組織の肉眼的観察を実施した。また、各動物の以下に示す器官の重量(実重量)を測定したほか、各器官の重量を剖検日の体重で除して比体重値(相対重量)を算出した。ただし、甲状腺は、約24時間固定液に浸漬した後、気管から分離して重量を測定した。

重量測定器官

脳、胸腺、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、甲状腺(上皮小体を含む)、副腎

肉眼的観察に引き続き、次頁に示す器官あるいは組織を固定保存した。なお、固定液としては、精巣および精巣上体はブアン液、その他の器官・組織ならびに精巣および精巣上体の長期保存には0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液を選択した。さらに、全例の*印を付した器官・組織および病変部をパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した後、投与期間終了時の対照群および高用量群の*印を付した器官・組織ならびに全例の病変部については、光学顕微鏡を用いて病理組織学的に検査した。この検査の結果、肝臓、腎臓および脾臓では、被験物質投与に起因した可能性のある変化が認められたため、この他の群でも組織学的検査を実施した。なお、脾臓で

黄色色素沈着が認められたことから、雌雄全例の脾臓について鉄染色標本を作製し、ヘモジデリンであることを確認した。また、脾臓と同一標本上にある腎臓においても雄の一部で黄色色素沈着が認められたため、同様に観察を行い、ヘモジデリンであることを確認した。雄の腎臓では、尿細管上皮細胞細胞質内に好酸性顆粒物が認められたことから、雄全例の腎臓について PAS 染色を施して確認し、所見名を硝子滴とした。さらに、肝臓では、小葉中間帯肝細胞の空胞化が観察されたため、雄の対照および高用量群の肝臓について、オイルレッドO染色を施して、空胞が脂肪変性であることを確認した。

固定保存器官・組織

脳*、脊髄、心臓*、大動脈、肺(気管支を含む)*、気管、肝臓*、腎臓*、脾臓*、膵臓、顎下腺、舌下腺、舌、食道、胃*、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、盲腸、精巣*、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣*、子宮、腔、膀胱、下垂体、甲状腺*、上皮小体、副腎*、大腿骨および骨髄、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節、胸腺、眼球、視神経、ハーダー腺、皮膚(腹部)、乳腺、坐骨神経、骨格筋(下腿部)、病変部

7. データの解析

体重、摂餌量、摂水量、尿量、尿比重、器官重量ならびに血液学検査および血液生化学検査の各値は、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。対照群と被験物質投与群との間の平均値の差の有意性についての検定は、試験群の構成が対照群を含めて3群以上ある場合に多重比較を用い、2群の場合にはt検定を用いた。多重比較の場合、まず、Bartlettの方法により分散の一様性について検定し、分散が一様であった場合は一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合にDunnett法を用いて多重比較した。分散が一様でなかった場合にはKruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意性が認められた場合にDunnett型の検定法を用いて多重比較した。ただし、いずれかの群で分散が0となった場合、Bartlettの検定は行わずにKruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意性が認められた場合にDunnett型の検定法により多重比較を行った。また、全ての群で分散が0となった場合、検定は不可能であるため実施しなかった。

t検定の場合は、まず、F検定を行い、等分散の場合はStudentのt検定、不等分散の場合にはAspin-Welchのt検定を行った。ただし、どちらかの群で分散が0となった場合、検定は不可能であるため実施しなかった。

その他、尿の半定量的検査成績については、 $m \times n$ の分割表を用いる χ^2 検定を行い、

その結果、群間に有意性が認められた場合は、Dunnett 型の検定法により多重比較を実施し、対照群と被験物質投与群との間の有意差検定をした。ただし周辺度数が 0 になった場合は、検定は不可能であるため実施しなかった。病理組織所見では、グレード分けしたデータは Mann-Whitney の U 検定により、また陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により、対照群と各被験物質投与群との間の有意差検定を行った。ただし、いずれの検定においても、有意水準は 5% とした。

なお、尿検査において、投与第 1 週では潜血で 1 例、投与第 4 週では糖で 2 例、通常と異なる色調の呈色反応を示したため、該当データは採用しなかった。この他には、いずれの期間の検査においても、尿の色調が試験紙による試験成績に影響を与えていないことが確認されたため、試験紙による検査結果を本試験データとして採用することとした。

【 結 果 】

1. 死亡例

投与期間および回復試験期間中に死亡例はなかった。

2. 一般状態 (Table 1、Appendix 1)

100 mg/kg 投与群では淡褐色尿が、雄で投与第4日以降、雌で投与第15日以降、いずれも投与第28日まで散見された。また、同群では雌で投与第7日以降、雄では投与第13日以降に流涎が観察された。この流涎は、投与保定時から投与後約2時間半の間に観察され、100 mg/kg 投与群の雌1例では、投与前の体重測定時および流涎消失後の一般状態観察時の投与を伴わない保定時にも認められた。また、流涎は30 mg/kg 投与群でも雌で投与第21日、雄で投与第25日から28日の間に認められた。さらに、100 mg/kg 投与群の雄では、投与第28日から翌日の回復試験期間第1日にかけて緑色調の便が観察された。その他、対照群および30 mg/kg 投与群の雄1例で痂皮が観察された以外、雌雄各群とも歩行状態および散瞳の有無を含めて一般状態の変化は観察されなかった。

3. 体重 (Fig. 1、Table 2、Appendix 2)

投与期間中に有意な増減はなかったが、100 mg/kg 投与群で投与第1日から2日にかけて増加抑制の傾向にあり、雄1例および雌5例で体重が減少した。

回復試験期間中、100 mg/kg 投与群の雄で対照群と比較して有意に低値となった。しかし、この2群の投与最終日体重について、回復試験供試動物および投与期間終了時剖検動物の5匹毎に分けた平均値を算出した結果、対照群は374.5 gおよび368.1 g、100 mg/kg 投与群では349.7 gおよび364.4 gとなったことから、100 mg/kg 投与群の雄では体重の比較的軽い動物が回復試験に用いられたために有意差が認められたと考えられた。この他には、対照群と被験物質投与群との間に有意差は確認されなかった。

4. 摂餌量 (Fig. 2、Table 3、Appendix 3)

投与第1日から2日にかけて測定した投与第1週の摂餌量は、100 mg/kg 投与群の雌雄で対照群と比較して有意に減少した。この他には、雌雄とも観察期間中を通して対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

5. 摂水量 (Table 4、Appendix 4)

いずれの測定においても、対照群と被験物質投与群との間に有意な増減はなかった。

6. 尿検査 (Table 5、Appendix 5)

投与第1週の検査では、30 mg/kg 投与群の雄および 100 mg/kg 投与群の雌雄で黄色から褐色を呈する尿が散見され、100 mg/kg 投与群の雄で色調が有意に変化した。また、30 mg/kg 以上を投与した群の雌雄でビリルビンが検出され、30 mg/kg 投与群の雄および 100 mg/kg 投与群の雌雄で有意に増加した。100 mg/kg 投与群の雄では、尿沈渣中の結晶が有意に減少した。この他、100 mg/kg 投与群の雄の蛋白の低下および 30 mg/kg 投与群の雄のケトン体の上昇が対照群と比較して有意な変化となったが、蛋白およびケトン体の検出程度はいずれも対照群の程度の範囲内にあったことから、被験物質投与による影響ではないと判断した。

投与第4週の検査では、100 mg/kg 投与群の雌雄で、尿が黄色から褐色を呈し、色調が有意に変化した。また、10 および 30 mg/kg 投与群の雌ならびに 100 mg/kg 投与群の雌雄でビリルビンが検出され、30 mg/kg 投与群の雌および 100 mg/kg 投与群の雌雄で有意に増加した。この他、有意差は認められなかったが、30 mg/kg 投与群の雄1例および 100 mg/kg 投与群の雄5例雌4例で尿蛋白が中等度(++)以上検出された。また、24時間尿について色調を確認した結果、100 mg/kg 投与群の雌雄全例および 30 mg/kg 投与群の雌2例で上層部が暗紫色を呈した。

回復第2週の検査では、100 mg/kg 投与群の雌のウロビリノーゲン濃度の上昇が有意な変化となった。この他には、いずれの項目にも対照群と被験物質投与群との間に有意差はなかったが、100 mg/kg 投与群の雄2例雌1例で尿蛋白が中等度(++)以上検出された。

7. 血液学検査 (Table 6、7、Appendix 6、7)

投与期間終了時屠殺例では、100 mg/kg 投与群の雌雄で、血色素量およびヘマトクリット値が有意に低下した。また、同群の雄では赤血球数の減少および血小板数の増加が有意な変化となり、雌でも有意差はなかったが同様の傾向が認められた。さらに、30 および 100 mg/kg 投与群の雄では、平均赤血球容積が有意に減少した。この他、100 mg/kg 投与群では、白血球分類において、雌雄のリンパ球比率の低下および雄の好中球比率の上昇が有意な変化となり、雌でも有意ではなかったが、好中球比率が上昇する傾向にあった。

また、雌雄とも網状赤血球比率が高い傾向にあった。骨髓像検査では、30 および 100 mg/kg 投与群の雌の好中性後骨髓球比率、30 mg/kg 投与群の雌の巨核球比率、100 mg/kg 投与群の雌の好中球比率および総顆粒球比率、30 mg/kg 投与群の雄の正染赤芽球比率がそれぞれ有意に上昇し、100 mg/kg 投与群の雌のリンパ球比率が有意に低下した。リンパ球比率は 100 mg/kg 投与群の雄でも低下する傾向にあった。この他、30 mg/kg 投与群の雌では好塩基球比率が有意に低下したが、好塩基球が骨髓球全体に占める割合は僅かであるため値のばらつきが大きく、また、いずれの個体も対照群の値の範囲内であったため、被験物質投与による低下ではないと判断した。

回復試験終了時屠殺例では、100 mg/kg 投与群の雌雄で、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量が有意に減少し、血小板数および網状赤血球比率が有意に上昇した。また、同群の雄では、単球比率が有意に低下したが、投与期間中に認められた変化ではなく、同系統同週齢の動物のコントロールデータ^{9, 10)}と比較すると対照群の単球比率が高かったことから、被験物質投与による変化ではないと判断した。骨髓像検査では、100 mg/kg 投与群の雄で多染性赤芽球比率および総赤芽球比率が有意に上昇し、M/E 比が有意に低下した。同群の雌では有意差が認められなかったものの同様の傾向にあり、この他、好中球比率が有意に低下した。

この他には、雌雄各被験物質投与群とも対照群と比較して有意な変化はなかった。

8. 血液生化学検査 (Table 8、Appendix 8)

投与期間終了時屠殺例では、10 および 30 mg/kg 投与群の雌および 100 mg/kg 投与群の雌雄で、総蛋白濃度が有意に上昇し、30 および 100 mg/kg 投与群の雌では、アルブミン濃度も有意に上昇した。この他、100 mg/kg 投与群では、雌雄で、総コレステロール濃度およびカルシウム濃度が有意に上昇し、雄の総ビリルビン濃度の上昇および雌のGOT 活性の低下が有意な変化となった。なお、雌では、10 mg/kg 投与群でも総蛋白濃度が上昇した個体でアルブミン濃度が上昇する傾向にあった。

回復試験期間終了時屠殺例では、100 mg/kg 投与群の雌雄で、総蛋白濃度およびカルシウム濃度が有意に上昇した。また、同群では、雌で尿素窒素濃度、ブドウ糖濃度、総コレステロール濃度およびトリグリセライド濃度が上昇した。その他、同群では、雄のブドウ糖濃度および ALP活性の低下ならびに GPT活性の上昇が、雌の塩素濃度の低下がそれぞれ有意な変化となったが、いずれも投与期間終了時に同様の変化は認められず、関連項目の

変化も確認できなかったため、被験物質投与による影響ではないと判断した。

この他の検査項目には、対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。

9. 病理学検査

1) 器官重量 (Table 9、10、Appendix 9、10)

投与期間終了時屠殺例では、100 mg/kg 投与群の雌雄で、肝臓の実重量および相対重量が有意に増加し、30 mg/kg 投与群の雌雄でも肝臓の相対重量が有意に増加した。また、100 mg/kg 投与群では、雄で腎臓の相対重量および実重量が、雌で腎臓および脾臓の相対重量が有意に増加した。脾臓重量は、100 mg/kg 投与群の雄においても相対重量および実重量が高値を示す個体が散見され、雌の実重量も増加する傾向にあった。

回復試験期間終了時屠殺例では、100 mg/kg 投与群の雌雄で、肝臓の相対重量が有意に増加し、雄で脾臓の実重量および相対重量および腎臓の相対重量が、雌では肝臓の実重量がそれぞれ有意に増加した。また、同群の雄で、脳の相対重量が増加したが、投与期間終了時に認められなかった変化であり、剖検時体重が対照群と比較して低かったことも考慮して、被験物質投与あるいは投与中止による変化ではないと判断した。

2) 剖検所見 (Table 11、Appendix 11)

①投与期間終了時屠殺例

投与期間終了時屠殺例では、肝臓、脾臓、腎臓および前胃粘膜で以下に示すような変化が観察された。

肝臓は、100 mg/kg 投与群の雌雄全例および 30 mg/kg 投与群の雄 1 例で腫大していた。また、脾臓は、100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で腫大していた。

腎臓では、30 mg/kg 投与群の雄 1 例で腫大が観察された。この他、30 mg/kg 投与群の雄 1 例で片側性の腎盂の拡張が観察されたが、今回、対照群雄 1 例でも確認され、同系統同週齢の動物⁸⁾からも認められている変化であることから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

前胃粘膜では、100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で肥厚が観察された。

この他、30 mg/kg 投与群の雄 1 例の皮膚に痂皮が認められた以外に、雌雄各群とも変化は観察されなかった。

②回復試験期間終了時屠殺例

回復試験期間終了時屠殺例では、100 mg/kg 投与群の雄 4 例雌 1 例で肝臓の腫大が、雄 2 例雌 1 例で脾臓の腫大が、雄 2 例で腎臓の腫大が観察された。この他に、雌雄各群とも変化は観察されなかった。

3) 組織学検査 (Table 12、Appendix 12、Photo 1~4)

①投与期間終了時屠殺例

剖検時に変化が観察された肝臓、脾臓および腎臓で以下に示すような変化が観察されたが、肥厚が観察された前胃粘膜では、組織学的な変化は観察されなかった。

肝臓では、30 mg/kg 以上を投与した群の雌雄で、好酸性を示す肝細胞の肥大が観察され (Photo 1)、30 mg/kg 投与群の雄および 100 mg/kg 投与群の雌雄で変化の程度および発生頻度が有意に増加した。また、小葉中間帯の脂肪化が、30 mg/kg 投与群の雄 3 例および 100 mg/kg 投与群の雄 5 例雌 3 例で観察され (Photo 1)、雄では変化の程度および発生頻度が用量依存的に増加し、いずれも有意な変化となった。さらに、雄では 100 mg/kg 投与群の 5 例全例で軽微な肝細胞の単細胞壊死が認められ、変化の程度および発生頻度が有意な増加となったが、雌では、同様の変化が対照群 1 例および 100mg/kg 投与群の 3 例で認められたため有意差はなかった。この他、対照群を含む雌雄各群で門脈周囲の脂肪化が多数例で観察されたが、用量依存的な変化ではなかったため、被験物質投与による変化ではないと判断した。

脾臓では、対照群の雄 1 例を除く雌雄全例でヘモジデリン沈着が認められたが、30 mg/kg 投与群の雌および 100 mg/kg の雌雄でやや程度が強い傾向にあり、100 mg/kg 投与群の雌で有意な増強となった。また、髄外造血の増加も雌雄全例で観察されたが (Photo 2、3)、100 mg/kg 投与群の雌雄でやや程度が強い傾向にあり、100 mg/kg 投与群の雌で有意な増強となった。この他、脾臓では、急性のうっ血が、対照群の雌および 100 mg/kg 投与群の雌雄で散見されたが、対照群と被験物質投与群との間に程度の差はなく、被験物質投与による影響ではないと判断した。

腎臓では、10 および 30 mg/kg 投与群の雌各 1 例を除く雌雄全例で、好塩基性尿細管が観察されたが、100 mg/kg 投与群の雄 3 例で他よりやや強い軽度な変化であったほかは、いずれも軽微な変化であった。この軽度な好塩基性尿細管が観察された 100 mg/kg 投与群の雄 3 例中 2 例では、軽微なヘモジデリン沈着も認められた。この他、腎臓では、30 mg/kg 投与群の雌 1 例を除く雌雄全例でリンパ球浸潤が観察され、雄で

硝子滴、蛋白円柱および腎盂の拡張が、雌で皮髄境界部の鉍質沈着が散見されたが、いずれも対照群と被験物質投与群との間で有意差はなく、程度の差もなかったことから、被験物質投与による変化ではないと判断した。剖検時に腎臓の腫大が認められた 30 mg/kg 投与群の雄 1 例では他の個体と異なる所見は観察されず、器官重量の増加も僅かであったため明瞭な被験物質投与による変化ではないと判断した。

この他、肺では、雄の対照群と 100 mg/kg 投与群の各 1 例で泡沫細胞の集簇巣が、対照群の雄 1 例で限局性の好中球浸潤が観察されたが、いずれも対照群に観察されている変化であるため、被験物質投与による影響ではないと判断した。また、剖検時に皮膚に痂皮が認められた 30 mg/kg 投与群の雄 1 例の皮膚では、痂皮以外に変化は認められず、30 mg/kg 投与群の雄 1 例にのみ認められた変化であったことから、偶発的な変化であると判断した。

その他、組織学的検査を行った胃、脳、心臓、副腎、甲状腺、精巣および卵巣には変化が認められなかった。

②回復試験期間終了時屠殺例

組織学的検査を行った肝臓、脾臓および腎臓で以下に示すような変化が観察された。

肝臓では、100 mg/kg 投与群の雄全例で、単細胞壊死および小葉中間帯の脂肪化が認められ (Photo 4)、変化の程度および発生頻度とも有意な増加となった。雌では、単細胞壊死が対照群の 1 例および 100 mg/kg 投与群の 4 例で、小葉中間帯の脂肪化が 100 mg/kg 投与群の 2 例で観察され、いずれも対照群と比較して発生頻度は増加する傾向にあったが、有意差は認められなかった。この他、門脈周囲性の脂肪化が対照群を含む多数例で観察された。

脾臓では、対照群を含む雌雄全例でヘモジデリン沈着および髄外造血の増加が観察されたが、100 mg/kg 投与群の雌雄で変化の程度が強い傾向にあり、雄のヘモジデリン沈着および雌の髄外造血の増加が、それぞれ有意な増強となった。

腎臓では、好塩基性尿細管が対照群を含む各群の多数例で観察されたが、100 mg/kg 投与群の雄 2 例で軽度な変化であった他は、いずれも軽微な変化であった。この他、対照群を含む雌雄多数例でリンパ球浸潤が観察され、雄で硝子滴が、雌で皮髄境界部の鉍質沈着が散見されたが、いずれも対照群と被験物質投与群との間で有意差はなく、程度の差もなかったことから、被験物質投与による変化ではないと判断した。

【 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 10、30 および 100 mg/kg の用量で雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに28日間反復経口投与した結果、主として、肝臓、血液および腎臓に以下のような変化が認められた。

肝臓では、30 および 100 mg/kg 投与群で、腫大、肝重量の増加、好酸性肝細胞肥大、小葉中間帯の脂肪化が認められ、100 mg/kg 投与群の雄では軽度の肝細胞単細胞壊死が全例に観察された。PIPDの急性経口毒性試験¹⁾では肝障害が示唆されており、本試験でも肝臓がPIPDの標的器官であると考えられた。今回、2週間の回復試験終了後も単細胞壊死は認められ、その他の変化も程度は軽減したが引き続き観察された。吸収されたPIPDは一部肝臓で代謝されてグルクロン酸抱合体となり、未変化体とともに尿中および胆汁中に排泄されること、腸管循環ならびに脂肪組織および肝臓中への蓄積により、長時間残存する可能性の高い物質であることが報告されている¹¹⁾。肝細胞の単細胞壊死は酵素誘導後の退行性変化である可能性もあるが、毒性変化の可逆性を考察する際には、被験物質の残留性についても考慮する必要があると思われた。なお、今回、甲状腺の重量および組織には変化が認められなかった。この他、100 mg/kg 投与群の雌雄で総コレステロール濃度が上昇し、雄では小葉中間帯の肝細胞脂肪化の程度と個体別に一致した。しかし、雌では一致せず、総コレステロール濃度の上昇と被験物質投与との関連は示唆されるものの、肝臓の変化との関連は不明であった。また、回復試験終了時に雌で認められたトリグリセライド濃度の上昇も被験物質投与に起因した変化であるのか否か判断できなかった。

100 mg/kg 投与群の雌雄および 30 mg/kg 投与群の雄で黄色から褐色を呈する尿が散見された。しかし、投与中止翌日には回復したこと、尿検査時に潜血反応が陰性であったこと、尿中にPIPDあるいはその代謝産物が排泄されるということ¹¹⁻¹³⁾、本被験物質は紫褐色を呈し、24時間尿の上層部は暗紫色を示したことから、溶血による褐色化ではなく、尿中に排泄されたPIPDあるいはその代謝物に由来する変化であると考えられた。また、100 mg/kg 投与群の雄で観察された緑色調の便もPIPDもしくはその代謝産物に由来する可能性はあるが、本試験結果のみでは判断できなかった。なお、これら色調の変化は雄で強く認められたが、代謝の性差によるものであるのかは本試験結果のみでは判断できず、また、肝臓の好酸性肝細胞肥大、肝小葉中間帯の脂肪化、血漿総蛋白濃度の上昇などいくつかの項目で雌雄差が認められたが、いずれも大差はなく、性差は明瞭ではなかった。

100 mg/kg 投与群では雌雄で、赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値が低下し、貧血が示唆された。さらに、同群の雌雄で尿中にビリルビンが検出され、雄で血中ビリルビン濃度が上昇したこと、組織学的に雌雄で、脾臓のヘモジデリン沈着がやや程度が強い傾向にあったこと、貧血に伴って網状赤血球比率が上昇したことから溶血性貧血が示唆された。なお、回復試験後も、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量が低い状態にあったが、網状赤血球比率の上昇、骨髓像における赤芽球系細胞比率の上昇、脾臓重量の増加、脾臓における髄外造血の増加が認められたため、貧血は回復過程にあると考えられた。また、回復試験期間中の尿検査でビリルビンが検出されなかったことから溶血は投与中止により停止することが示唆された。この他、100 mg/kg 投与群では、雌雄で血小板数の増加、好中球比率の上昇およびリンパ球比率の低下が認められ、骨髓像でも、雌で顆粒球系細胞比率および巨核球比率が上昇し、雌雄でリンパ球比率が低下した。貧血時に骨髓の造血機能が亢進した場合、二次的に末梢の血小板および顆粒球系白血球が増加することが知られており^{14, 15)}、本試験でもPIPD投与による貧血の結果、二次的に血小板および好中球が増加したことが推測された。なお、10 mg/kg 投与群の雌および 30 mg/kg 投与群の雌雄でも尿中ビリルビンが検出され、30 mg/kg 投与群の雄で平均赤血球容積が減少し、雌で骨髓像が変化した。尿中ビリルビンは肝臓への影響を反映している可能性もあるが、いずれもPIPD投与による変化であると判断した。

腎臓では、100 mg/kg 投与群の雌雄で器官重量が増加したが、同群の雄 3 例で他の動物が軽微であるのに対し、それよりもやや強い軽度の好塩基性尿細管が認められ、この雄 3 例中 2 例で軽微なヘモジデリン沈着が認められた以外には被験物質投与に起因すると考えられる明らかな病理学的変化はなかった。しかし、投与第 4 週および回復試験終了時に、100 mg/kg 投与群ではこの雄 3 例を含む雌雄数例で中等度以上尿蛋白が検出され、PIPDの急性経口毒性試験では、死亡例で近位尿細管上皮の変性あるいは壊死が認められてPIPD投与による腎障害が示唆されているため、本試験でも尿細管上皮細胞に変性ないし壊死が生じた可能性が高い。また、これらの変化は投与中止により回復しなかったものの、程度は軽減する傾向にあり、回復性が示唆された。この他、投与第 3 日の尿検査で 100 mg/kg の雄の沈渣中の結晶陰性例が増加し、同様の傾向は雌でも観察された。沈渣中の結晶は、尿のpHあるいは尿量などに左右されるが、投与第 3 日には尿量を測定しておらず、pHは対照群と比較して大差がなかったことから、被験物質投与に起因した変化である可能性は否定できないもののその原因は不明であった。血液生化学検査において、雌では 10 mg/kg

以上を投与した群でアルブミン濃度の上昇を伴う総蛋白濃度の上昇が認められ、雄でも 100 mg/kg 投与群で総蛋白濃度が上昇した。また、100 mg/kg 投与群の雌雄でカルシウム濃度の上昇が認められた。肝障害時には、アルブミン濃度上昇を伴うカルシウム濃度の上昇が認められることが知られているが、本試験結果からは、総蛋白濃度およびカルシウム濃度の変化とPIPDの肝臓に対する影響との関連は不明であった。

30 および 100 mg/kg 投与群の雌雄で投与保定時から流涎が観察され、100 mg/kg 投与群の雌 1 例では、投与を伴わない体重測定時および流涎消失後の観察時にも流涎が認められた。刺激性物質の経口投与に際しては、しばしば反射性の流涎が観察され、100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で認められたような前胃粘膜の肥厚が生じることが知られている¹⁶⁾。また、PIPDの単回経口毒性試験では被験物質の刺激性が示唆されていることから、今回認められた流涎は被験物質の刺激性に由来する可能性が示唆された。

この他、摂餌量の減少に伴って投与第 1 日から 2 日にかけて 100 mg/kg 投与群の雌雄で体重の増加が抑制され、被験物質投与による影響であると考えられるが、摂餌量減少を示唆するような一般状態の変化は観察されず、成因は明らかとはならなかった。

以上の結果から、本試験条件下におけるPIPDの無作用量は雄で 10 mg/kg、雌では 10 mg/kg 未満であると考えられた。また、PIPDの標的器官は肝臓、血液、腎臓であることが示唆され、主として肝重量の増加を伴う好酸性肝細胞肥大および小葉中間帯の脂肪化、溶血性貧血、尿蛋白の上昇が生じることが明らかとなった。2 週間の投与中止によって、溶血は終息して貧血は回復過程にあり、好酸性肝細胞肥大および小葉中間帯の脂肪化は軽減したが、肝細胞の単細胞壊死は明らかな回復性を示さなかった。

【 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) 森村智美ら: *N*-フェニル-*N'*-イソプロピル-*p*-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 (食薬セ研第12-1890号)
- 9) Matsuzawa, T., Inoue, H. edit.: Biological Reference Data on CD(SD)IGS Rats-1998, CD(SD)IGS Study Group. Yokohama (1998)
- 10) Matsuzawa, T., Inoue, H. edit.: Biological Reference Data on CD(SD)IGS Rats-1999, CD(SD)IGS Study Group. Yokohama (1999)
- 11) 齊藤浩司, 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) Jackson, C. W., Simone J. V., Edwards, C. C.: The relationship of anemia and thrombocytosis. J. Lab. Clin. Med. 84(3): 357-368 (1974)
- 15) 谷本義文: 「血液学—ヒトと動物との接点—」, 清至書院, 東京 (1982)
- 16) 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)

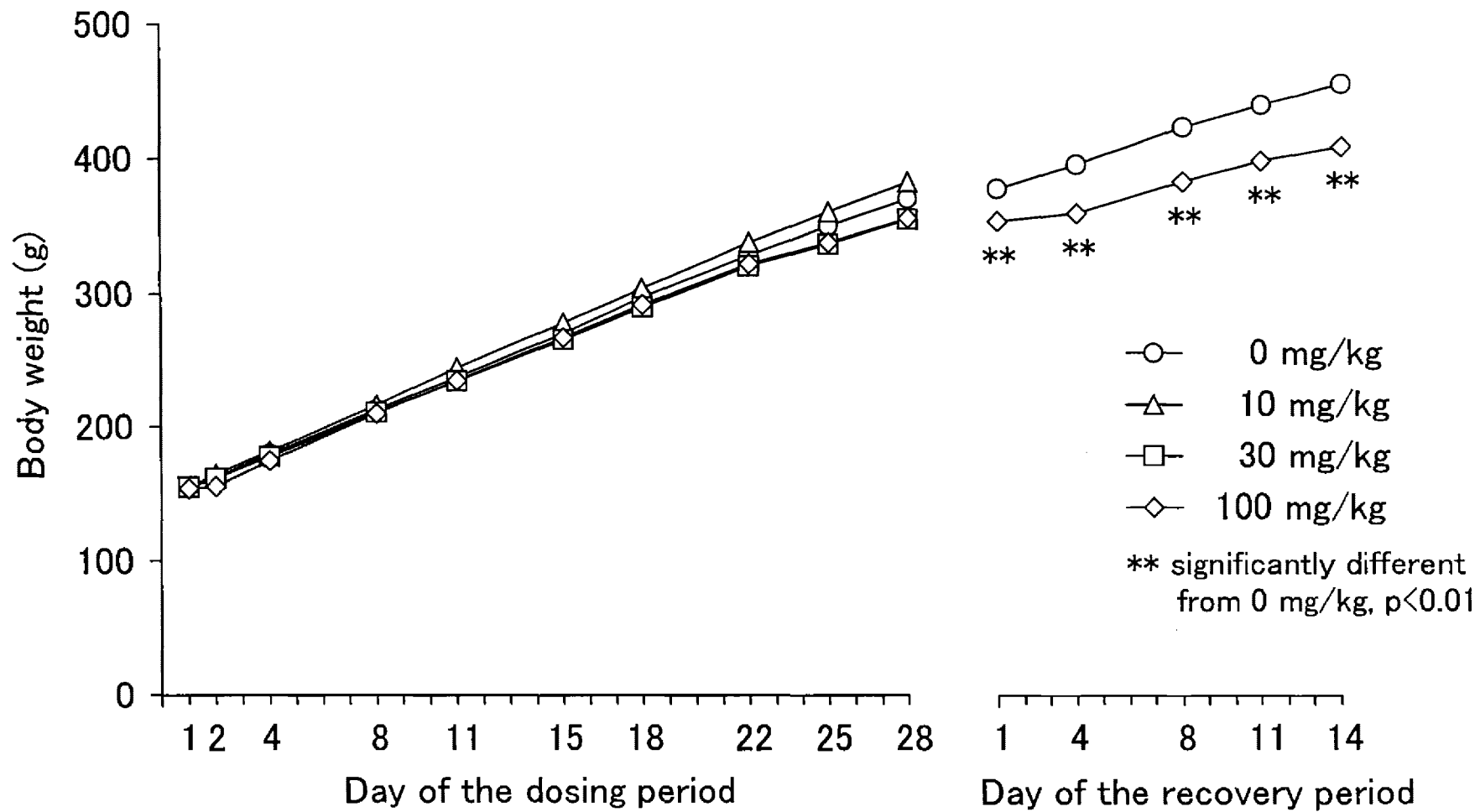


Fig. 1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Body weight changes in males

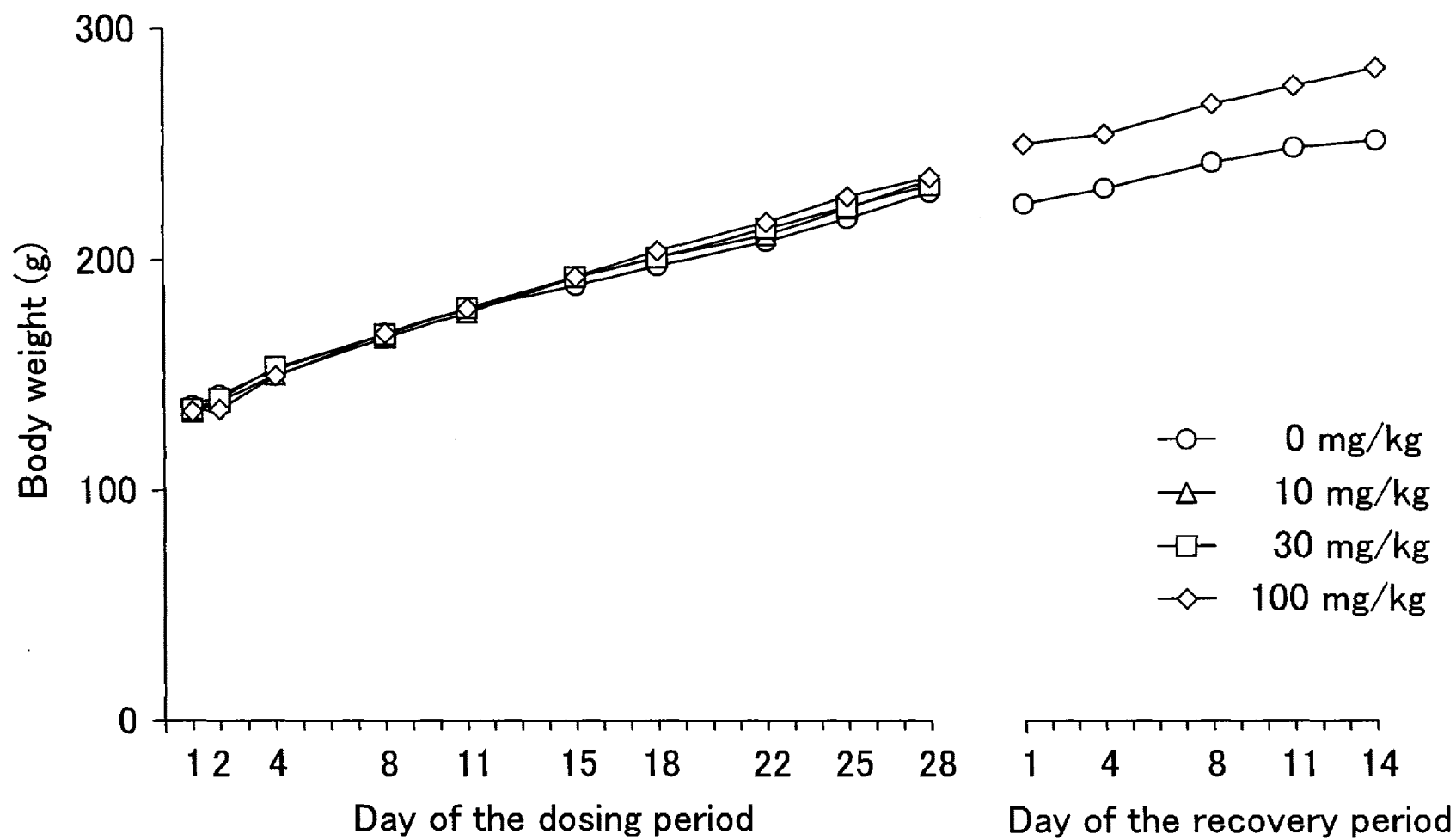


Fig. 1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Body weight changes in females

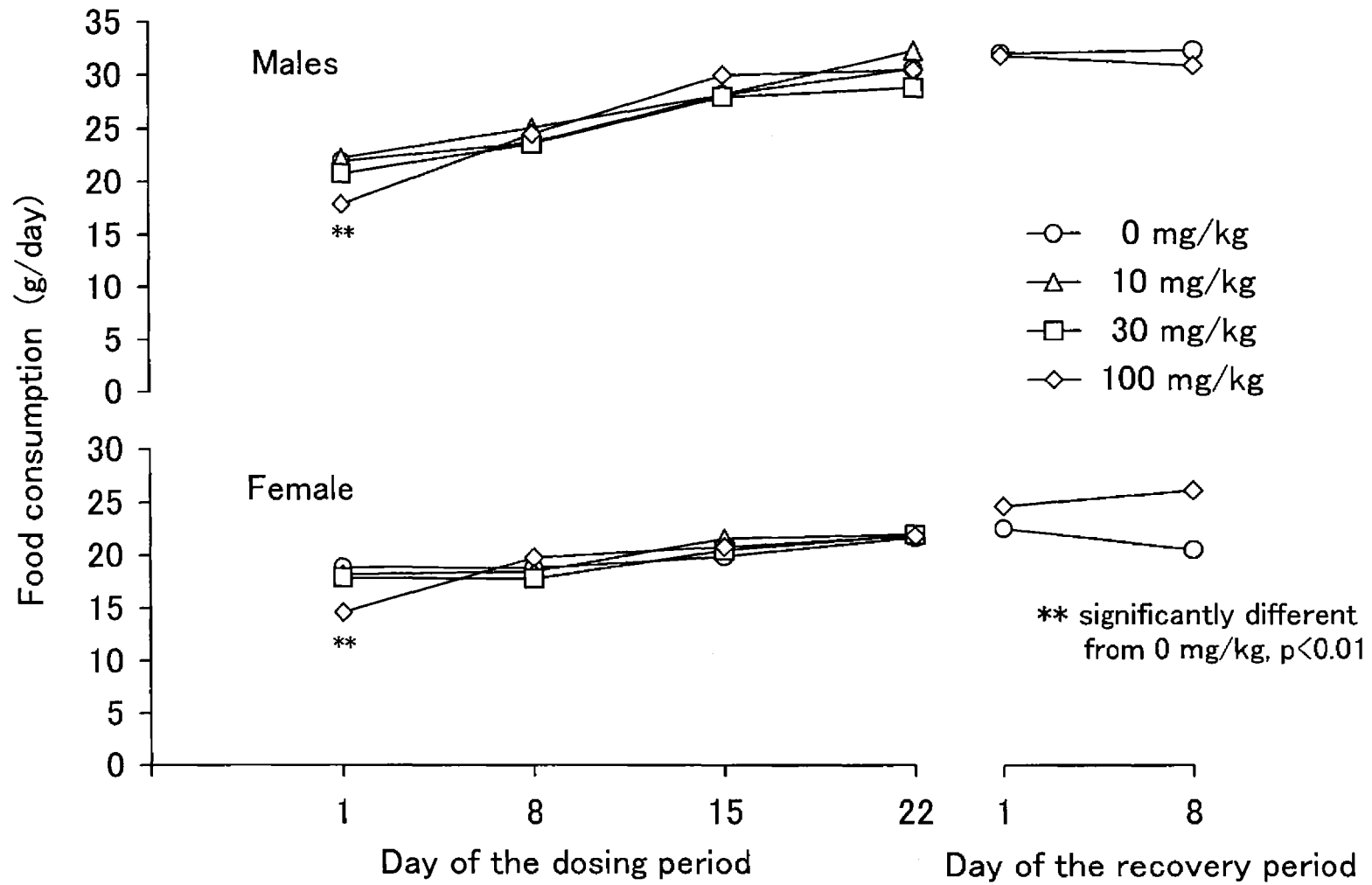


Fig. 2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats
Food consumption in males and females

Table 1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Clinical signs in males

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs																												Day of ^{a)} the recovery period		Total				
			Day of the dosing period																												1	2-14					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28							
Brownish urine	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	30	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	100	10	-	-	-	3	1	-	-	1	1	2	1	-	4	2	2	2	-	-	-	2	1	2	2	2	-	-	3	-	-	-	-	-	8		
Salivation	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	10	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	30	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	
	100	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	1	2	2	-	1	-	1	1	2	2	2	2	2	1	2	-	-	-	-	5		
Greenish feces	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	10	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	30	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	100	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	8	
Crust on the back	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1		
	10	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	30	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	
	100	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

-, no animal showed the sign

a), the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 100 mg/kg groups

Table 2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Body weight changes in males

Dose (mg/kg)	Number of animals	Day of the dosing period									
		1	2	4	8	11	15	18	22	25	28
0	10	154.9	162.2	179.8	213.1	237.8	270.9	297.9	329.2	351.3	371.3
		±4.5	±5.3	±6.7	±8.1	±9.1	±13.2	±12.9	±14.0	±13.8	±15.3
10	5	154.9	164.5	181.8	217.0	244.8	278.8	304.5	338.8	361.7	383.6
		±6.1	±5.2	±7.9	±10.4	±12.0	±14.4	±13.7	±19.2	±22.8	±25.2
30	5	154.9	161.4	177.5	211.4	234.8	266.0	290.4	321.1	337.7	356.2
		±6.3	±6.9	±10.2	±18.6	±20.1	±25.9	±27.1	±31.0	±29.9	±32.6
100	10	153.7	155.4	174.3	210.4	235.2	267.8	292.6	323.0	338.7	357.0
		±6.4	±7.4	±7.3	±10.8	±12.9	±16.1	±15.7	±19.7	±21.2	±23.2

Dose (mg/kg)	Number of animals	Day of the recovery period				
		1	4	8	11	14
0	5	377.8	396.0	423.7	440.1	456.3
		±7.9	±11.5	±14.0	±15.8	±17.1
100	5	353.9 **	359.8 **	383.3 **	398.7 **	409.3 **
		±8.2	±9.3	±10.3	±10.3	±9.9

Parameter, mean(g)±S.D.

**, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Body weight changes in females

Dose (mg/kg)	Number of animals	Day of the dosing period									
		1	2	4	8	11	15	18	22	25	28
0	10	136.7 ±6.6	141.5 ±8.0	152.7 ±8.8	168.1 ±11.1	179.0 ±11.8	188.9 ±13.7	197.6 ±14.8	208.4 ±18.6	218.7 ±17.3	229.8 ±20.9
10	5	134.2 ±4.3	138.5 ±3.9	150.3 ±3.1	166.4 ±4.7	177.3 ±5.0	192.6 ±7.0	201.4 ±11.1	211.2 ±8.2	223.0 ±12.3	235.4 ±13.3
30	5	135.2 ±6.2	139.8 ±7.7	153.6 ±7.1	167.6 ±10.3	179.1 ±14.0	192.5 ±17.5	201.2 ±19.1	214.0 ±23.1	223.7 ±25.0	233.0 ±24.3
100	10	134.5 ±6.8	135.2 ±7.1	149.8 ±10.1	168.5 ±12.6	179.1 ±13.2	192.9 ±16.1	204.4 ±17.5	217.1 ±18.5	228.3 ±19.9	236.6 ±20.0

Dose (mg/kg)	Number of animals	Day of the recovery period				
		1	4	8	11	14
0	5	224.8 ±14.2	231.8 ±20.5	243.0 ±21.0	249.6 ±19.2	252.7 ±19.4
100	5	251.0 ±22.5	255.2 ±23.0	268.4 ±26.1	276.3 ±25.4	284.0 ±25.4

Parameter, mean(g)±S.D.

Table 3

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Food consumption in males and females

Sex	Dose (mg/kg)	Initial number of animals ^{a)}	Day of the dosing period				Day of the recovery period	
			1	8	15	22	1	8
Male	0	10	22.0 ±1.3	23.7 ±2.1	28.2 ±2.5	30.7 ±2.9	32.2 ±1.1	32.5 ±1.9
	10	5	22.3 ±1.0	25.1 ±1.2	28.2 ±1.6	32.4 ±3.2		
	30	5	20.8 ±1.7	23.6 ±2.5	28.0 ±3.4	28.9 ±2.3		
	100	10	17.9 ** ±1.8	24.5 ±2.3	30.1 ±2.9	30.6 ±2.7	32.0 ±1.8	31.1 ±1.1
Female	0	10	18.9 ±2.1	18.8 ±1.6	19.9 ±2.1	21.7 ±3.0	22.4 ±2.9	20.4 ±2.8
	10	5	18.2 ±1.5	18.5 ±1.2	21.6 ±1.5	22.0 ±2.2		
	30	5	17.9 ±1.9	17.8 ±1.7	20.5 ±1.4	22.0 ±3.5		
	100	10	14.6 ** ±2.0	19.8 ±1.6	20.8 ±2.5	21.9 ±1.7	24.5 ±2.2	26.0 ±5.0

Parameter, mean(g)±S.D.

**, significantly different from 0 mg/kg, p<0.01

a), the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 100 mg/kg groups

Table 4

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Water intake in males and females

Sex	Dose (mg/kg)	Initial number ^{a)} of animals	On day 23 of the dosing period	On day 9 of the recovery period
Male	0	10	37.0 ±5.2	37.3 ±6.3
	10	5	43.1 ±5.0	
	30	5	39.4 ±7.4	
	100	10	44.3 ±11.5	37.3 ±5.1
Female	0	10	23.1 ±8.8	29.7 ±10.8
	10	5	22.9 ±12.9	
	30	5	25.7 ±6.4	
	100	10	32.3 ±6.1	35.6 ±10.4

Parameter, mean(mL)±S.D.

a), the recovery test was performed in 5 animales for each of the 0 and 100 mg/kg groups

Table 5-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Urinalysis in males and females on day 3 of the dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color				Turbidity	pH					Protein			Glucose			Ketone			Bilirubin			Occult blood		Urobilinogen	
			ly	y	yb	b		-	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	-	-	±	+	-	+	++	-	±	+		
Male	0	10	10	0	0	0	10	0	3	5	2	0	2	6	2	10	8	2	0	10	0	0	10	7	3			
	10	5	5	0	0	0	5	0	1	4	0	0	3	2	0	5	4	1	0	5	0	0	5	5	0			
	30	5	3	2	0	0	5	0	2	3	0	0	1	0	4	5	1	4	0	*	1	4	0	*	5	2	3	
	100	10 ^{a)}	0	6	3	1	*	10	0	3	7	0	0	9	0	1	*	10	10	0	0	0	6	4	**	9	4	6
Female	0	10	10	0	0	0	10	0	2	2	4	2	10	0	0	10	10	0	0	10	0	0	10	9	1			
	10	5	5	0	0	0	5	0	1	3	1	0	4	0	1	5	4	1	0	5	0	0	5	4	1			
	30	5	5	0	0	0	5	0	0	3	1	1	5	0	0	5	5	0	0	4	1	0	5	5	0			
	100	10	8	2	0	0	10	1	3	3	3	0	9	1	0	10	10	0	0	0	6	4	**	10	7	3		

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment								
			Red blood cells		Crystal		Cast	White blood cells		Epithelial cells	
			-	±	-	±	-	-	±	-	±
Male	0	10	10	0	10	10	10	10	0		
	10	5	5	0	5	5	5	5	0		
	30	5	5	0	5	5	5	5	0		
	100	10	10	5	5	*	10	10	0		
Female	0	10	10	1	9	10	10	10	0		
	10	5	5	0	5	5	5	5	0		
	30	5	5	1	4	5	5	5	0		
	100	10	10	4	6	10	10	8	2		

Color ly, light yellow; y, yellow; yb, yellowish brown; b, brown
 Turbidity -, negative
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL
 Glucose -, negative
 Ketone -, negative; ±, trace; +, slight
 Bilirubin -, negative; +, slight; ++, moderate
 Occult blood -, negative
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Red blood cells -, not observed
 Crystal -, not observed; ±, a few
 Cast -, not observed
 White blood cells -, not observed
 Epithelial cells -, not observed; ±, a few

*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$

***, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

a), the data on occult blood was calculated in 9 animals

Table 5-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Urinalysis in males and females on day 23 of the dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color				Turbidity -	pH						Protein					Glucose		Ketone			Bilirubin			Occult blood		Urobilinogen			
			ly	y	yb	b		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	+++	-	±	-	±	+	-	+	++	-	±	±	+	
Male	0	10	10	0	0	0	10	0	0	1	5	1	2	1	0	3	7	0	0	10	0	6	3	1	10	0	0	10	0	8	2	
	10	5	5	0	0	0	5	0	0	0	1	1	3	0	0	3	2	0	0	5	0	3	2	0	5	0	0	4	1	5	0	
	30	5	5	0	0	0	5	0	0	2	2	1	0	0	0	0	4	1	0	5	0	2	3	0	5	0	0	5	0	5	0	
	100	10 ^{a)}	1	6	0	3	*	10	0	1	5	3	1	0	0	0	0	5	3	2	8	0	7	2	1	0	5	5	**	10	0	4
Female	0	10	10	0	0	0	10	0	1	3	1	3	1	1	9	1	0	0	0	10	0	10	0	0	10	0	0	10	0	10	0	
	10	5	5	0	0	0	5	1	1	0	2	1	0	0	3	1	1	0	0	5	0	5	0	0	3	2	0	5	0	4	1	
	30	5	5	0	0	0	5	1	1	2	0	1	0	0	3	1	1	0	0	5	0	5	0	0	1	4	0	*	5	0	5	0
	100	10	6	4	0	0	*	10	2	5	2	0	0	1	0	2	0	4	3	1	9	1	10	0	0	0	4	6	**	10	0	6

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment								Urinary volume (mL/24hr)	Specific gravity	
			Red blood cells		Crystal		Cast	White blood cells		Epithelial cells			
			-	±	-	±		-	±	-			±
Male	0	10	10	0	10	0	10	10	9	1	20.4±4.3	1.057±0.010	
	10	5	5	0	5	0	5	5	5	0	25.7±2.4	1.041±0.004	
	30	5	5	0	4	1	5	5	5	0	19.2±7.1	1.052±0.013	
	100	10	10	1	8	1	10	10	10	0	20.9±7.8	1.047±0.011	
Female	0	10	10	0	10	0	10	10	10	0	13.5±5.8	1.048±0.012	
	10	5	5	0	5	0	5	5	5	0	15.2±4.0	1.036±0.009	
	30	5	5	1	4	0	5	5	4	1	14.6±2.8	1.036±0.012	
	100	10	10	0	10	0	10	10	9	1	14.7±5.9	1.049±0.010	

Color ly, light yellow; y, yellow; yb, yellowish brown; b, brown
 Turbidity -, negative
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL; +++, ≥300 mg/dL
 Glucose -, negative; ±, 0.1 g/dL
 Ketone -, negative; ±, trace; +, slight
 Bilirubin -, negative; +, slight; ++, moderate
 Occult blood -, negative; ±, trace
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Red blood cells -, not observed
 Crystal -, not observed; ±, a few; +, abundant
 Cast -, not observed
 White blood cells -, not observed
 Epithelial cells -, not observed; ±, a few

*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$
 **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$
 a), the data of glucose was calculated in 8 animals

Table 5-3

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Urinalysis in males and females on day 9 of the recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color ly	Turbidity -	pH				Protein					Glucose -	Ketone			Bilirubin -	Occult blood -	Urobilinogen	
					6.5	7.0	7.5	8.0	-	±	+	++	+++		-	±	+			±	+
Male	0	5	5	5	0	3	1	1	0	0	5	0	0	5	0	3	2	5	5	2	3
	100	5	5	5	1	4	0	0	0	1	2	2	0	5	2	2	1	5	5	2	3
Female	0	5	5	5	2	1	2	0	4	0	1	0	0	5	5	0	0	5	5	3	2
	100	5	5	5	2	3	0	0	0	2	2	0	1	5	5	0	0	5	5	0	5 *

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment							Urinary volume (mL/24hr)	Specific gravity	
			Red blood cells -	Crystal - ± +			Cast -	White blood cells -	Epithelial cells - ±			
Male	0	5	5	0	5	0	5	5	5	0	20.5±3.8	1.059±0.011
	100	5	5	0	4	1	5	5	5	0	18.0±4.8	1.058±0.009
Female	0	5	5	1	4	0	5	5	5	0	14.1±6.2	1.054±0.013
	100	5	5	0	5	0	5	5	4	1	18.7±9.9	1.051±0.015

Color ly, light yellow
 Turbidity -, negative
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL; +++, ≥300 mg/dL
 Glucose -, negative
 Ketone -, negative; ±, trace; +, slight
 Bilirubin -, negative
 Occult blood -, negative
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Red blood cells -, not observed
 Crystal -, not observed; ±, a few; +, abundant
 Cast -, not observed
 White blood cells -, not observed
 Epithelial cells -, not observed; ±, a few

*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$

Table 6-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Hematological findings in males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Reticulocyte (%)
0	5	716 ± 34	14.2 ± 0.6	42.9 ± 1.9	59.9 ± 1.6	19.9 ± 0.8	33.2 ± 0.7	3.5 ± 1.7
10	5	742 ± 24	14.4 ± 0.3	43.4 ± 1.1	58.6 ± 0.7	19.3 ± 0.3	33.0 ± 0.2	3.6 ± 0.6
30	5	728 ± 38	13.9 ± 0.6	41.7 ± 1.9	57.4 * ± 1.7	19.1 ± 0.6	33.3 ± 0.2	3.2 ± 0.5
100	5	660 * ± 29	12.5 ** ± 0.4	37.4 ** ± 0.9	56.7 ** ± 1.1	18.9 ± 0.5	33.4 ± 0.7	4.9 ± 0.6

Dose (mg/kg)	Number of animals	WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	PT (sec)	APTT (sec)
0	5	109.2 ± 35.8	8 ± 4	1 ± 0	0 ± 0	5 ± 1	87 ± 5	115.0 ± 11.5	16.2 ± 4.2	19.3 ± 2.5
10	5	99.9 ± 21.0	10 ± 3	1 ± 0	0 ± 0	5 ± 2	84 ± 4	107.7 ± 13.7	16.0 ± 3.5	17.7 ± 4.7
30	5	107.3 ± 10.2	6 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	4 ± 0	90 ± 1	113.8 ± 5.7	15.1 ± 1.2	20.2 ± 1.2
100	5	121.2 ± 21.0	17 * ± 7	1 ± 0	0 ± 0	5 ± 2	77 * ± 7	141.5 ** ± 12.9	15.2 ± 2.9	20.0 ± 2.4

Parameter, mean \pm S.D.*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 6-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Hematological findings in females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Reticulocyte (%)
0	5	711 ± 29	14.1 ± 0.5	41.8 ± 1.5	58.8 ± 1.8	19.9 ± 0.6	33.8 ± 0.2	2.0 ± 0.7
10	5	734 ± 35	14.2 ± 0.7	42.1 ± 2.3	57.4 ± 1.9	19.3 ± 0.7	33.6 ± 0.4	2.1 ± 0.8
30	5	690 ± 52	13.5 ± 0.9	40.1 ± 2.4	58.1 ± 1.8	19.6 ± 0.6	33.7 ± 0.2	1.9 ± 0.8
100	5	657 ± 32	12.5 ** ± 0.6	37.5 * ± 2.1	57.1 ± 1.1	19.0 ± 0.3	33.1 ± 0.6	3.1 ± 0.6

Dose (mg/kg)	Number of animals	WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	PT (sec)	APTT (sec)
0	5	38.0 ± 8.2	9 ± 2	2 ± 1	0 ± 0	5 ± 2	85 ± 4	108.9 ± 15.4	12.3 ± 0.9	17.2 ± 1.7
10	5	48.9 ± 17.5	8 ± 4	1 ± 1	0 ± 0	4 ± 2	87 ± 3	105.7 ± 19.1	12.4 ± 0.6	17.2 ± 0.8
30	5	57.8 ± 22.1	7 ± 3	1 ± 0	0 ± 0	3 ± 1	88 ± 3	113.8 ± 14.7	11.8 ± 1.0	16.0 ± 1.5
100	5	53.6 ± 12.1	18 ± 8	1 ± 0	0 ± 0	4 ± 2	76 * ± 7	127.9 ± 12.8	11.0 ± 0.6	15.1 ± 0.9

Parameter, mean \pm S.D.*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 6-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Hematological findings in males at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Reticulocyte (%)
0	5	780 ± 48	15.1 ± 0.8	45.4 ± 2.5	58.2 ± 1.2	19.4 ± 0.6	33.3 ± 0.3	2.3 ± 0.7
100	5	768 ± 22	13.9 * ± 0.3	41.8 * ± 1.2	54.5 ** ± 1.1	18.2 ** ± 0.3	33.3 ± 0.1	4.3 ** ± 0.9

Dose (mg/kg)	Number of animals	WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	PT (sec)	APTT (sec)
0	5	97.4 ± 24.0	8 ± 3	1 ± 0	0 ± 0	7 ± 1	83 ± 4	101.6 ± 6.3	18.0 ± 3.4	21.4 ± 1.5
100	5	122.6 ± 28.7	7 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	4 ** ± 1	88 ± 1	119.1 ** ± 4.3	20.8 ± 1.4	22.6 ± 1.2

Parameter, mean \pm S.D.*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 6-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Hematological findings in females at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Reticulocyte (%)
0	5	731 ± 28	14.4 ± 0.6	42.5 ± 1.9	58.2 ± 1.2	19.7 ± 0.4	33.8 ± 0.4	2.4 ± 1.0
100	5	695 ± 30	13.0 ** ± 0.6	38.4 * ± 2.0	55.3 ** ± 0.7	18.7 ** ± 0.2	33.8 ± 0.6	4.4 * ± 1.0

Dose (mg/kg)	Number of animals	WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	PT (sec)	APTT (sec)
0	5	36.3 ± 16.1	11 ± 5	4 ± 3	0 ± 0	6 ± 4	80 ± 12	99.3 ± 5.2	12.8 ± 1.0	17.2 ± 1.2
100	5	57.1 ± 22.9	8 ± 1	2 ± 1	0 ± 0	5 ± 1	85 ± 4	128.7 ** ± 7.1	12.3 ± 0.7	18.4 ± 0.4

Parameter, mean \pm S.D.*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 7-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Myelogram in males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Myeloblast (%)	Promyelocyte (%)	Neutrophilic myelocyte (%)	Neutrophilic meta-myelocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophilic myelocyte (%)	Eosinophilic meta-myelocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil, all types (%)	Total granulocyte (%)
0	5	2.2 ±0.4	2.3 ±1.1	4.5 ±1.4	11.8 ±1.0	20.9 ±1.4	1.3 ±0.4	2.4 ±0.3	0.8 ±0.1	0.2 ±0.3	46.3 ±1.7
10	5	3.0 ±1.7	3.7 ±0.7	5.0 ±1.4	8.9 ±0.8	20.6 ±1.0	0.7 ±0.3	2.0 ±0.4	0.8 ±0.3	0.1 ±0.2	45.4 ±2.8
30	5	2.8 ±1.4	3.9 ±0.9	5.1 ±1.5	9.7 ±2.4	18.8 ±1.1	0.7 ±0.3	1.6 ±0.7	0.7 ±0.5	0.3 ±0.4	43.6 ±5.8
100	5	2.1 ±0.8	2.6 ±1.3	6.3 ±1.2	11.3 ±2.3	21.6 ±5.7	1.2 ±0.4	2.2 ±1.2	0.4 ±0.2	0.2 ±0.2	48.0 ±7.2

Dose (mg/kg)	Number of animals	Pro-erythroblast (%)	Basophilic erythroblast (%)	Polychromatic erythroblast (%)	Normoblast (%)	Total erythroblast (%)	Myeroid / Erythroid	Lymphocyte (%)	Histiocyte (%)	Plasma cell (%)	Mega-karyocyte (%)	Mast cell (%)
0	5	0.2 ±0.2	2.2 ±1.4	17.9 ±3.6	10.0 ±0.9	30.2 ±4.4	1.6 ±0.3	20.6 ±3.9	2.6 ±1.1	0.0 ±0.0	0.2 ±0.2	0.1 ±0.2
10	5	0.2 ±0.1	2.3 ±1.4	17.2 ±2.2	12.0 ±2.9	31.7 ±3.1	1.5 ±0.2	19.6 ±2.4	2.8 ±1.7	0.2 ±0.3	0.2 ±0.2	0.1 ±0.3
30	5	0.2 ±0.2	2.1 ±1.0	17.1 ±2.4	14.8 ** ±2.3	34.2 ±3.3	1.3 ±0.2	18.3 ±5.5	3.2 ±1.0	0.4 ±0.3	0.2 ±0.2	0.1 ±0.2
100	5	0.2 ±0.2	2.9 ±1.3	18.1 ±4.0	12.4 ±1.7	33.5 ±6.2	1.5 ±0.5	15.6 ±3.9	2.4 ±1.1	0.2 ±0.1	0.3 ±0.3	0.0 ±0.1

Parameter, mean ±S.D.

**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 7-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Myelogram in females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Myeloblast (%)	Promyelocyte (%)	Neutrophilic myelocyte (%)	Neutrophilic meta-myelocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophilic myelocyte (%)	Eosinophilic meta-myelocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil, all types (%)	Total granulocyte (%)
0	5	2.2 ±0.4	2.1 ±0.6	5.4 ±1.5	7.3 ±1.6	17.4 ±2.8	1.7 ±0.6	2.6 ±0.5	0.9 ±0.3	0.6 ±0.4	40.1 ±3.3
10	5	2.5 ±0.7	2.4 ±0.6	5.2 ±0.9	9.0 ±0.6	17.0 ±1.2	1.2 ±0.6	3.0 ±0.5	1.1 ±0.8	0.2 ±0.2	41.7 ±2.4
30	5	2.2 ±0.7	2.2 ±0.7	4.6 ±2.4	10.2 * ±1.3	21.9 ±5.4	1.1 ±0.5	3.1 ±0.8	0.8 ±0.5	0.2 * ±0.2	46.4 ±6.5
100	5	2.4 ±0.5	2.5 ±0.4	4.2 ±1.2	10.4 * ±2.5	23.8 * ±3.8	1.4 ±0.8	2.6 ±0.6	1.0 ±0.6	0.6 ±0.2	48.8 * ±4.9

Dose (mg/kg)	Number of animals	Pro-erythroblast (%)	Basophilic erythroblast (%)	Polychromatic erythroblast (%)	Normoblast (%)	Total erythroblast (%)	Myeroid / Erythroid	Lymphocyte (%)	Histiocyte (%)	Plasma cell (%)	Mega-karyocyte (%)	Mast cell (%)
0	5	0.4 ±0.2	3.1 ±0.5	14.1 ±3.4	13.1 ±1.8	30.7 ±5.0	1.3 ±0.3	26.0 ±5.0	3.1 ±1.2	0.0 ±0.1	0.1 ±0.2	0.0 ±0.0
10	5	0.3 ±0.3	3.1 ±1.3	15.3 ±3.4	13.7 ±1.5	32.4 ±4.0	1.3 ±0.2	23.1 ±3.6	2.5 ±0.5	0.0 ±0.0	0.2 ±0.2	0.1 ±0.1
30	5	0.2 ±0.4	3.5 ±1.3	13.6 ±2.6	13.1 ±3.4	30.4 ±4.6	1.6 ±0.4	19.8 ±5.8	2.2 ±1.0	0.2 ±0.2	1.0 ** ±0.7	0.0 ±0.0
100	5	0.2 ±0.2	2.8 ±1.2	15.8 ±4.0	13.9 ±3.6	32.6 ±5.9	1.6 ±0.5	14.5 ** ±3.8	3.5 ±1.0	0.2 ±0.2	0.4 ±0.2	0.0 ±0.0

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 7-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Myelogram in males at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Myeloblast (%)	Promyelocyte (%)	Neutrophilic myelocyte (%)	Neutrophilic meta-myelocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophilic myelocyte (%)	Eosinophilic meta-myelocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil, all types (%)	Total granulocyte (%)
0	5	2.6 ±1.0	2.3 ±0.7	5.6 ±3.1	10.9 ±1.1	26.1 ±4.9	1.3 ±0.5	2.2 ±1.1	0.8 ±0.2	0.4 ±0.3	52.1 ±6.4
100	5	3.2 ±1.0	2.8 ±0.7	5.2 ±1.8	10.2 ±2.6	20.8 ±4.4	0.8 ±0.4	1.6 ±0.8	0.9 ±0.3	0.2 ±0.2	45.6 ±5.4

Dose (mg/kg)	Number of animals	Pro-erythroblast (%)	Basophilic erythroblast (%)	Polychromatic erythroblast (%)	Normoblast (%)	Total erythroblast (%)	Myeroid / Erythroid	Lymphocyte (%)	Histiocyte (%)	Plasma cell (%)	Mega-karyocyte (%)	Mast cell (%)
0	5	0.4 ±0.3	4.1 ±1.7	11.3 ±1.3	10.6 ±1.6	26.4 ±4.0	2.0 ±0.4	17.4 ±6.6	3.4 ±1.3	0.2 ±0.3	0.3 ±0.4	0.2 ±0.2
100	5	0.1 ±0.2	5.5 ±2.0	17.6 ** ±1.7	12.8 ±2.5	36.0 ** ±2.7	1.3 ** ±0.2	13.4 ±4.3	4.2 ±1.8	0.5 ±0.6	0.2 ±0.2	0.0 ±0.0

Parameter, mean ±S.D.

**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 7-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Myelogram in females at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Myeloblast (%)	Promyelocyte (%)	Neutrophilic myelocyte (%)	Neutrophilic meta-myelocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophilic myelocyte (%)	Eosinophilic meta-myelocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil, all types (%)	Total granulocyte (%)
0	5	2.8 ±0.9	3.1 ±1.2	4.3 ±1.6	8.6 ±0.5	24.1 ±3.7	0.9 ±0.6	2.1 ±0.3	0.8 ±0.3	0.5 ±0.3	47.3 ±4.2
100	5	2.8 ±1.0	2.2 ±1.0	4.3 ±1.5	8.8 ±0.7	17.6 * ±2.4	1.1 ±0.4	3.0 ±1.7	1.7 ±1.0	0.7 ±0.4	42.1 ±3.2

Dose (mg/kg)	Number of animals	Pro-erythroblast (%)	Basophilic erythroblast (%)	Polychromatic erythroblast (%)	Normoblast (%)	Total erythroblast (%)	Myeroid / Erythroid	Lymphocyte (%)	Histiocyte (%)	Plasma cell (%)	Mega-karyocyte (%)	Mast cell (%)
0	5	0.4 ±0.5	3.8 ±1.1	14.8 ±4.3	7.6 ±4.0	26.6 ±7.4	1.9 ±0.5	22.6 ±5.8	2.9 ±1.0	0.3 ±0.2	0.1 ±0.3	0.1 ±0.1
100	5	0.1 ±0.2	4.0 ±1.4	19.3 ±4.1	11.8 ±2.7	35.2 ±7.1	1.3 ±0.3	18.1 ±4.5	4.0 ±1.7	0.4 ±0.3	0.2 ±0.2	0.1 ±0.2

Parameter, mean ± S.D.

*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 8-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Biochemical findings in males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri-glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	5	5.5 ±0.3	3.1 ±0.2	1.28 ±0.06	14 ±2	0.5 ±0.1	138 ±24	42 ±6	33 ±18	0.10 ±0.03
10	5	5.4 ±0.3	3.1 ±0.2	1.37 ±0.18	15 ±3	0.5 ±0.0	136 ±8	44 ±8	38 ±11	0.10 ±0.03
30	5	5.7 ±0.2	3.1 ±0.2	1.26 ±0.17	15 ±2	0.6 ±0.1	134 ±16	60 ±15	23 ±5	0.09 ±0.01
100	5	6.3 * ±0.1	3.3 ±0.2	1.09 ±0.11	15 ±1	0.5 ±0.1	120 ±9	108 ** ±25	24 ±5	0.15 ** ±0.02

Dose (mg/kg)	Number of animals	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	5	7.8 ±0.3	9.9 ±0.5	144.8 ±1.0	3.95 ±0.18	106.5 ±1.9	425 ±30	31 ±4	76 ±17	0 ±1
10	5	8.0 ±0.3	10.4 ±0.5	143.9 ±0.8	3.80 ±0.06	106.0 ±0.6	413 ±79	32 ±6	69 ±9	0 ±0
30	5	7.9 ±0.4	10.6 ±0.1	144.3 ±1.0	3.92 ±0.15	106.4 ±1.9	353 ±52	28 ±5	64 ±11	1 ±0
100	5	7.4 ±0.4	11.0 ** ±0.3	143.7 ±1.1	3.87 ±0.22	104.7 ±0.2	367 ±47	31 ±10	68 ±19	0 ±0

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 8-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Biochemical findings in females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri-glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	5	5.2 ±0.2	3.1 ±0.2	1.53 ±0.09	18 ±3	0.6 ±0.0	124 ±20	52 ±13	26 ±4	0.10 ±0.03
10	5	5.7 ** ±0.2	3.4 ±0.3	1.56 ±0.25	16 ±1	0.6 ±0.0	127 ±17	58 ±11	28 ±8	0.07 ±0.00
30	5	5.8 ** ±0.1	3.5 * ±0.1	1.56 ±0.07	17 ±3	0.6 ±0.1	117 ±12	67 ±11	21 ±9	0.08 ±0.01
100	5	6.3 ** ±0.3	3.8 ** ±0.2	1.50 ±0.08	17 ±2	0.6 ±0.1	117 ±6	128 ** ±13	22 ±7	0.10 ±0.03

Dose (mg/kg)	Number of animals	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	5	6.7 ±0.8	9.3 ±0.6	144.9 ±1.1	3.70 ±0.15	109.3 ±1.4	258 ±49	33 ±12	75 ±17	1 ±1
10	5	6.0 ±0.5	9.7 ±0.1	144.3 ±0.8	3.60 ±0.31	108.4 ±1.1	227 ±50	20 ±2	59 ±4	1 ±0
30	5	6.5 ±0.9	10.0 ±0.3	144.6 ±1.1	3.71 ±0.31	108.4 ±0.9	217 ±34	22 ±5	57 ±3	1 ±0
100	5	6.0 ±0.3	10.3 ** ±0.1	143.9 ±1.5	3.85 ±0.30	108.3 ±1.8	211 ±43	20 ±3	47 ** ±6	1 ±0

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from 0 mg/kg, p<0.05

**, significantly different from 0 mg/kg, p<0.01

Table 8-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Biochemical findings in males at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri-glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	5	5.1 ±0.2	3.0 ±0.1	1.43 ±0.08	15 ±2	0.7 ±0.1	162 ±13	37 ±6	49 ±12	0.05 ±0.02
100	5	5.6 * ±0.3	3.1 ±0.1	1.25 ±0.16	16 ±1	0.7 ±0.1	142 * ±12	49 ±10	38 ±6	0.04 ±0.02

Dose (mg/kg)	Number of animals	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	5	7.8 ±0.4	9.2 ±0.2	144.6 ±1.9	4.12 ±0.22	104.5 ±2.2	361 ±66	29 ±5	67 ±11	0 ±0
100	5	7.7 ±0.3	9.6 ** ±0.2	145.0 ±1.3	4.17 ±0.27	105.8 ±1.9	265 * ±28	39 * ±5	72 ±10	0 ±0

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 8-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Biochemical findings in females at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri-glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	5	5.5 ±0.2	3.3 ±0.1	1.56 ±0.19	17 ±2	0.7 ±0.0	114 ±14	53 ±15	30 ±7	0.06 ±0.02
100	5	5.9 * ±0.2	3.4 ±0.2	1.36 ±0.19	22 * ±4	0.7 ±0.0	145 ** ±14	84 ** ±8	56 * ±17	0.05 ±0.02

Dose (mg/kg)	Number of animals	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	5	6.1 ±0.6	9.4 ±0.1	144.6 ±1.4	4.31 ±0.09	109.5 ±1.7	145 ±46	24 ±3	60 ±5	0 ±1
100	5	6.0 ±0.4	9.8 ** ±0.2	144.0 ±0.6	3.90 ±0.38	107.3 * ±0.7	147 ±39	23 ±4	53 ±6	1 ±1

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from 0 mg/kg, p<0.05

**, significantly different from 0 mg/kg, p<0.01

Table 9-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Absolute organ weights in males and females at the end of the dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Lung (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)
Males	0	5	330.2 ±17.1	1921.7 ±102.1	548.4 ±74.8	1162.5 ±108.1	11262.3 ±1031.3	2780.9 ±192.3	756.4 ±146.4	23.6 ±3.0	52.0 ±9.0	3053.8 ±226.7
	10	5	346.2 ±21.5	1894.3 ±65.9	623.7 ±139.8	1207.1 ±90.2	11862.8 ±1227.4	2834.7 ±194.1	721.9 ±64.1	22.4 ±3.8	53.4 ±7.5	2792.1 ±229.7
	30	5	321.6 ±31.6	1873.1 ±33.5	514.7 ±88.9	1195.1 ±56.4	12356.2 ±1315.6	2741.1 ±301.4	707.0 ±173.4	21.9 ±3.3	53.9 ±11.6	2911.2 ±234.0
	100	5	326.4 ±27.4	1884.9 ±91.3	577.2 ±154.5	1195.3 ±91.3	19036.6 ** ±2429.4	3256.8 * ±184.1	863.3 ±200.5	21.9 ±5.0	56.6 ±1.9	2775.5 ±112.4
Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Lung (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries (mg)
Females	0	5	214.5 ±18.4	1790.0 ±19.5	485.7 ±77.4	925.2 ±94.5	6833.1 ±1025.3	1805.6 ±178.6	501.4 ±95.5	18.1 ±3.0	69.3 ±18.9	82.9 ±10.9
	10	5	212.4 ±11.3	1803.7 ±50.6	465.5 ±66.3	911.9 ±48.3	7384.6 ±1013.5	1916.9 ±107.3	497.5 ±18.3	17.2 ±2.6	66.8 ±10.2	86.3 ±13.5
	30	5	212.5 ±20.8	1772.7 ±49.1	494.0 ±95.7	911.1 ±85.5	8010.6 ±814.1	1818.9 ±152.4	499.2 ±63.6	16.1 ±3.9	64.2 ±9.4	84.7 ±14.6
	100	5	202.5 ±5.0	1752.6 ±36.0	447.3 ±33.5	910.8 ±57.5	10925.2 ±432.1 **	1958.7 ±178.9	555.4 ±44.9	16.4 ±0.9	78.7 ±8.5	95.3 ±14.7

Parameter, mean ± S.D.

*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 9-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Absolute organ weights in males and females at the end of the recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Lung (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)
Males	0	5	421.4 ±18.9	1901.6 ±62.2	488.9 ±104.9	1319.0 ±42.1	13427.1 ±1121.1	3154.3 ±265.7	752.3 ±60.9	22.6 ±3.6	54.2 ±7.8	3339.9 ±132.9
	100	5	371.3 ** ±9.4	1895.7 ±41.2	470.4 ±73.8	1266.3 ±71.8	13250.1 ±1357.9	3196.7 ±165.5	901.5 * ±115.4	18.9 ±4.2	52.9 ±5.4	3209.3 ±296.2
Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Lung (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries (mg)
Females	0	5	233.7 ±16.7	1771.9 ±58.5	405.7 ±58.5	949.5 ±78.3	6786.9 ±688.4	1910.9 ±209.1	528.5 ±67.1	14.5 ±2.2	74.5 ±9.5	89.7 ±17.5
	100	5 ^{a)}	255.9 ±23.6	1801.9 ±50.4	401.2 ±130.0	1024.6 ±100.3	9886.8 ** ±1182.8	2120.7 ±125.4	564.2 ±112.4	14.3 ±2.6	75.3 ±13.2	93.0 ±16.4

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

a), organ weight of ovaries was calculated from 4 animals,

because the right ovary of No.51 was not measured for malformation

Table 10-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Relative organ weights in males and females at the end of the dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Lung (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Thyroid gland (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)
Males	0	5	330.2 ±17.1	5.824 ±0.226	1.661 ±0.197	3.525 ±0.322	34.068 ±1.680	8.420 ±0.288	2.286 ±0.386	0.072 ±0.008	0.157 ±0.023	9.256 ±0.636
	10	5	346.2 ±21.5	5.489 ±0.397	1.818 ±0.495	3.496 ±0.319	34.231 ±2.432	8.187 ±0.229	2.096 ±0.279	0.065 ±0.014	0.155 ±0.021	8.075 * ±0.618
	30	5	321.6 ±31.6	5.870 ±0.584	1.595 ±0.170	3.732 ±0.207	38.421 * ±1.152	8.521 ±0.331	2.183 ±0.360	0.069 ±0.014	0.167 ±0.025	9.080 ±0.598
	100	5	326.4 ±27.4	5.792 ±0.327	1.751 ±0.314	3.664 ±0.099	58.206 ** ±3.890	10.018 ** ±0.793	2.630 ±0.495	0.067 ±0.012	0.175 ±0.015	8.533 ±0.502
Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Lung (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Thyroid gland (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
Females	0	5	214.5 ±18.4	8.397 ±0.772	2.267 ±0.314	4.325 ±0.413	31.714 ±2.486	8.409 ±0.169	2.335 ±0.371	0.085 ±0.016	0.320 ±0.071	0.386 ±0.035
	10	5	212.4 ±11.3	8.504 ±0.322	2.201 ±0.374	4.298 ±0.238	34.670 ±3.298	9.041 ±0.622	2.345 ±0.084	0.081 ±0.012	0.314 ±0.040	0.406 ±0.058
	30	5	212.5 ±20.8	8.391 ±0.613	2.309 ±0.265	4.291 ±0.118	37.719 ** ±1.584	8.580 ±0.433	2.346 ±0.156	0.076 ±0.017	0.303 ±0.040	0.397 ±0.037
	100	5	202.5 ±5.0	8.657 ±0.287	2.209 ±0.161	4.496 ±0.234	53.954 ** ±2.145	9.659 ** ±0.668	2.740 * ±0.162	0.081 ±0.005	0.389 ±0.043	0.471 ±0.077

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 10-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Relative organ weights in males and females at the end of the recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Lung (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Thyroid gland (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)
Males	0	5	421.4 ±18.9	4.523 ±0.320	1.160 ±0.240	3.138 ±0.227	31.857 ±2.209	7.513 ±0.909	1.788 ±0.157	0.054 ±0.010	0.129 ±0.023	7.935 ±0.405
	100	5	371.3 ** ±9.4	5.109 ** ±0.209	1.266 ±0.192	3.410 ±0.162	35.641 * ±2.880	8.614 * ±0.488	2.429 ** ±0.323	0.051 ±0.012	0.142 ±0.016	8.658 ±0.963
Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Lung (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Thyroid gland (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
Females	0	5	233.7 ±16.7	7.597 ±0.288	1.732 ±0.170	4.062 ±0.145	28.993 ±0.984	8.165 ±0.453	2.255 ±0.126	0.062 ±0.009	0.319 ±0.041	0.383 ±0.064
	100	5 ^{a)}	255.9 ±23.6	7.076 ±0.491	1.568 ±0.448	4.009 ±0.253	38.595 ** ±2.364	8.315 ±0.493	2.213 ±0.441	0.056 ±0.008	0.295 ±0.044	0.360 ±0.050

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$

a), organ weight of ovaries was calculated from 4 animals, because the right ovary of No.51 was not measured for malformation

Table 11-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Macroscopical findings in males at the end of the dosing period

Dose Grade	0 mg/kg		10 mg/kg		30 mg/kg		100 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	4	1	0	5
(Kidney)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Dilatation, pelvis, unilateral	4	1	5	0	4	1	5	0
Enlargement	5	0	5	0	4	1	5	0
(Spleen)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	4	1
(Stomach)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Thickening, mucosa, forestomach	5	0	5	0	5	0	4	1
(Skin)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Crust	5	0	5	0	4	1	5	0

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 11-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Macroscopical findings in females at the end of the dosing period

Dose Grade	0 mg/kg		10 mg/kg		30 mg/kg		100 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	0	5
(Spleen)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	4	1
(Stomach)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Thickening, mucosa, forestomach	5	0	5	0	5	0	4	1

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 11-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Macroscopical findings in males at the end of the recovery period

Dose Grade	0 mg/kg		100 mg/kg	
	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]	
Enlargement	5	0	1	4
(Kidney)	[5]		[5]	
Enlargement	5	0	3	2
(Spleen)	[5]		[5]	
Enlargement	5	0	3	2

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 11-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Macroscopical findings in females at the end of the recovery period

Dose	0 mg/kg		100 mg/kg	
	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]	
Enlargement	5	0	4	1
(Spleen)	[5]		[5]	
Enlargement	5	0	4	1

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 12-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Histological findings in males at the end of the dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						10 mg/kg						30 mg/kg						100 mg/kg							
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.		
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]							
Hypertrophy, hepatocyte, eosinophilic	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0**	5##	0	0	5	0	0	0**	5##
Single cell necrosis, hepatocyte	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0**	5##
Fatty change, midzonal	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3	0	1	2	2	0	0	0**	5##
Fatty change, periportal	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	3	2	0	0	5	2	3	0	0	0	0	0	3
(Spleen)	[5]						[5]						[5]						[5]							
Deposit, hemosiderin	1	3	1	0	0	4	0	4	1	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0	5
Hematopoiesis, extramedullary	0	0	3	2	0	5	0	1	2	2	0	5	0	0	4	1	0	5	0	0	1	4	0	0	0	5
Congestion, acute	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	2
(Kidney)	[5]						[5]						[5]						[5]							
Basophilic tubule	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	2	3	0	0	0	0	5
Cellular infiltration, lymphocyte	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	0	0	5
Cast, proteinous	3	2	0	0	0	2	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	2
Deposit, hemosiderin, tubular epithelium	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	2
Hyaline droplet, proximal tubule	3	1	1	0	0	2	3	0	2	0	0	2	2	1	2	0	0	3	3	0	2	0	0	0	0	2
Dilatation, pelvis	4	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0
(Lung & Bronchus)	[5]												[5]													
Accumulation, foam cell	4	1	0	0	0	1													4	1	0	0	0	0	0	1
Cellular infiltration, neutrophil, focal	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0	0	0
(Adrenal gland)	[5]												[5]													
No abnormalities																										
(Heart)	[5]												[5]													
No abnormalities																										
(Stomach)	[5]												[5]													
No abnormalities																										
(Brain)	[5]												[5]													
No abnormalities																										
(Thyroid gland)	[5]												[5]													
No abnormalities																										
(Testis)	[5]												[5]													
No abnormalities																										
(Skin)													[1]													
Crust																			0 0 1 0 0 1							

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

**, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test).##, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test).

Table 12-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Histological findings in females at the end of the dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						10 mg/kg						30 mg/kg						100 mg/kg						
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]						
Hypertrophy, hepatocyte, eosinophilic	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	0	4	1	0	0	0	5**
Single cell necrosis, hepatocyte	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	3
Fatty change, midzonal	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	3
Fatty change, periportal	2	3	0	0	0	3	2	2	1	0	0	3	0	2	3	0	0	5	0	3	2	0	0	0	5
(Spleen)	[5]						[5]						[5]						[5]						
Deposit, hemosiderin	0	2	3	0	0	5	0	3	2	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	0	5	0	0	5
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	4	1	0	0	5	0	0	5	0	0	0	5
Congestion, acute	4	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	1
(Kidney)	[5]						[5]						[5]						[5]						
Basophilic tubule	0	5	0	0	0	5	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4	0	5	0	0	0	0	5
Cellular infiltration, lymphocyte	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	1	4	0	0	0	4	0	4	1	0	0	0	5
Mineral deposit, corticomedullary junction	2	3	0	0	0	3	2	2	1	0	0	3	2	3	0	0	0	3	2	3	0	0	0	0	3
(Lung & Bronchus)	[5]												[5]												
No abnormalities																									
(Adrenal gland)	[5]												[5]												
No abnormalities																									
(Heart)	[5]												[5]												
No abnormalities																									
(Stomach)	[5]												[5]												
No abnormalities																									
(Brain)	[5]												[5]												
No abnormalities																									
(Thyroid gland)	[5]												[5]												
No abnormalities																									
(Ovary)	[5]												[5]												
No abnormalities																									

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

**, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test).##, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test).

Table 12-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of N-phenyl-N'-isopropyl-p-phenylenediamine in rats

Histological findings in males at the end of the dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						100 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]					
Hypertrophy, hepatocyte, eosinophilic	5	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	2
Single cell necrosis, hepatocyte	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5 **
Fatty change, midzonal	5	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	5 **
Fatty change, periportal	0	5	0	0	0	5	1	4	0	0	0	4
(Spleen)	[5]						[5]					
Deposit, hemosiderin	0	0	5	0	0	5	0	0	0	5	0	5 **
Hematopoiesis, extramedullary	0	2	3	0	0	5	0	0	2	3	0	5
(Kidney)	[5]						[5]					
Basophilic tubule	1	4	0	0	0	4	1	2	2	0	0	4
Cellular infiltration, lymphocyte	0	5	0	0	0	5	1	4	0	0	0	4
Hyaline droplet, proximal tubule	4	1	0	0	0	1	3	1	1	0	0	2

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

** , significantly different from 0 mg/kg, p<0.01 (Two-tailed Mann-Whitney U test).

, significantly different from 0 mg/kg, p<0.01 (One-tailed Fisher exact test).

Table 12-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *N*-phenyl-*N'*-isopropyl-*p*-phenylenediamine in rats

Histological findings in females at the end of the recovery period

Dose Grade	0 mg/kg						100 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]					
Single cell necrosis, hepatocyte	4	1	0	0	0	1	1	3	1	0	0	4
Fatty change, midzonal	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2
Fatty change, periportal	0	4	1	0	0	5	2	3	0	0	0	3
(Spleen)	[5]						[5]					
Deposit, hemosiderin	0	0	2	3	0	5	0	0	0	5	0	5
Hematopoiesis, extramedullary	0	4	1	0	0	5	0	0	3	2	0*	5
(Kidney)	[5]						[5]					
Basophilic tubule	1	4	0	0	0	4	0	5	0	0	0	5
Cellular infiltration, lymphocyte	0	5	0	0	0	5	1	4	0	0	0	4
Mineral deposit, corticomedullary junction	1	3	1	0	0	4	1	4	0	0	0	4

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

*, significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test).