



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最 終 報 告 書

ジシクロヘキシルアミンのラットを用いた経口投与による
簡易生殖毒性試験

R-714

目 次

	頁
目 次	1
要 約	9
緒 言	11
試験材料および方法	
1. 被験物質および被験液の調製	12
1) 被験物質	12
2) 被験液の調製	12
2. 試験動物	13
3. 飼育条件	13
4. 動物の識別およびケージへの表示	14
5. 投与量、群構成および動物数	14
6. 投与量の設定根拠	14
7. 投与経路、投与回数、投与方法および投与期間とその選択理由	15
8. 観察、測定、検査の方法および頻度	15
1) 雄(P)	15
(1) 一般状態の観察	15
(2) 体重測定	15
(3) 摂餌量測定	15
(4) 剖検および器官重量測定	15
(5) 病理組織学検査	16

	頁
2) 雌(P)	16
(1) 一般状態の観察	16
(2) 体重測定	16
(3) 摂餌量測定	16
(4) 膣スメア検査	16
(5) 分娩および哺育観察	16
(6) 剖検	17
(7) 病理組織学検査	17
3) 親動物(P)の交配	17
4) 新生児(F1)	17
(1) 新生児の観察	17
(2) 哺育児の観察および測定	17
9. 統計処理	18
1) 多重検定	18
2) χ^2 検定	18
3) Mann-Whitney の U 検定	18
4) 各種データの算出式	18

試験結果

I. 反復投与毒性	19
1. 雄(P)に及ぼす影響	19
1) 一般状態	19
2) 体重	19
3) 摂餌量	19
4) 剖検所見	19
5) 器官重量	19
6) 病理組織学検査	20
2. 雌(P)に及ぼす影響	20
1) 一般状態	20
2) 体重	20

	頁
3) 摂餌量	21
4) 剖検所見	21
5) 病理組織学検査	21
II. 生殖発生毒性	21
1. 親動物(P)に及ぼす影響	21
1) 性周期	21
2) 交尾率および受胎率	21
3) 妊娠期間、分娩および哺育状況	22
4) 生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率	22
2. 新生児(F1)に及ぼす影響	22
1) 生存児数、死産児数、分娩率および出生率	22
2) 性比、外表異常および生存性	22
3) 体重	23
4) 剖検所見	23
考 察	24
参考文献	26

Figures and Tables

Figure 1	Body weight changes of males
Figure 2	Food consumption of males
Figure 3	Body weight changes of females
Figure 4	Food consumption of females
Table 1, 2	Clinical signs of males
Table 3	Body weights of males
Table 4	Food consumption of males
Table 5	Gross pathological findings of males
Table 6	Absolute organ weights of males
Table 7	Relative organ weights of males
Table 8	Histopathological findings of males
Table 9	Clinical signs of females
Table 10, 11	Clinical signs of dams
Table 12	Body weights of females
Table 13	Body weights of dams
Table 14	Food consumption of females
Table 15	Food consumption of dams
Table 16	Gross pathological findings of dams
Table 17	Histopathological findings of females
Table 18	Estrous cycle
Table 19	Reproductive performance of males and females
Table 20	Findings of delivery on dams
Table 21	Findings of pups
Table 22	Body weights of pups
Table 23	Gross pathological findings of pups

要 約

ジシクロヘキシルアミンのラットにおける経口投与による簡易生殖毒性試験を行った。ジシクロヘキシルアミンの0（コーンオイル：対照群）、20、40 および 80mg/kg を1群雌雄各12匹のSprague-Dawley系SPFラット〔Crj:CD(SD)〕に経口投与し、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検索した。

I. 反復投与毒性

1. 雄（P）に及ぼす影響

- 1) 40mg/kg以下の投与群には一般状態、体重、摂餌量、剖検所見、精巣および精巣上体重量に被験物質投与の影響は認められなかった。
- 2) 80mg/kg投与群では、体重増加が抑制された。しかし、同群の一般状態、摂餌量、剖検所見、精巣および精巣上体重量ならびにこれら器官の病理組織学検査所見に被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 雌（P）に及ぼす影響

- 1) 40mg/kg以下の投与群には一般状態、体重、摂餌量および剖検所見に被験物質投与の影響は認められなかった。
- 2) 80mg/kg投与群では、妊娠21日および22日に各1例が死亡した。被験物質投与による一般状態の変化として、哺育期間に粗毛、児集め不良が認められた。交配前投与期間、妊娠期間および哺育期間の各期間における体重は増加が抑制され、摂餌量は低値を示した。しかし、剖検所見および卵巣の病理組織学検査所見に被験物質投与の影響は認められなかった。

以上、一般毒性学的な無影響量は、雌雄ともに40mg/kg/dayであると考えられた。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物（P）に及ぼす影響

- 1) 雌の性周期、雌雄の交尾および受胎、妊娠期間および分娩に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。

- 2) 哺育の異常は、40mg/kg 以下の投与群には認められなかった。しかし、80mg/kg 投与群では児集め不良の母動物が多く認められ、哺育 4 日までに生存児を有していた母動物は 4 例のみであった。
- 3) 生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率に被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 新生児 (F1) に及ぼす影響

- 1) 40mg/kg 以下の投与群には生存児数、死産児数および出生率に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。80mg/kg 投与群では死産児数が多く、生存児数が少ないため出生率は有意に低下した。しかし、いずれの投与群においても分娩率に被験物質投与の影響は認められなかった。
- 2) 新生児の性比に及ぼす被験物質投与の影響は認められず、被験物質投与に起因する外表異常も認められなかった。
- 3) 40mg/kg 以下の投与群では、新生児の生存率に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。80mg/kg 投与群では、哺育期間中の児の死亡が多く、同群の新生児生存率は、著しい低値を示した。
- 4) 40mg/kg 以下の投与群における新生児の体重に被験物質投与の影響は認められなかった。80mg/kg 投与群における新生児の体重は、雌雄とも生後 0 日および 4 日に低値を示した。
- 5) 生後 4 日の剖検では被験物質投与に起因する異常は認められなかった。

以上、生殖発生学的な無影響量は、雄に関しては 80mg/kg/day、雌に関しては 40mg/kg/day、新生児に関しては 40mg/kg/day であると考えられた。

緒 言

ジシクロヘキシルアミン (CAS 番号 : 101-83-7) は、シクロヘキサノールやアニリンを原料として合成され、染料、ゴム製品等の合成過程での触媒ならびにボイラーの錆防止剤や軟鋼の腐食防止を目的とする気相抑制剤として用いられる鎖式アミンである。本被験物質は、分子量 181.3、融点 -0.1°C の無色透明な液体であり、沸点 255.8°C 、揮発性は低いものの引火性を有している。

本被験物質は、ラット精細管を用いた試験において、アドレナリン α 受容体遮断作用に対する保護作用¹⁾、ノルアドレナリンの反応に対する増強作用^{2,3)}を有することが知られている。ノルアドレナリンの反応に対する増強作用は、アドレナリン受容体に対する直接作用ではなく、交感神経終末へのノルアドレナリンの再取り込み阻害によることが明らかになっており、高濃度では間接的な交感神経興奮による精細管収縮を示すことも知られている²⁾。また、本被験物質は、眼、咽喉、鼻の粘膜に対する刺激性を有し、毒性的にはラットにおける単回経口投与による 50%致死量は、373 mg/kg、ラットにおける 28 日間反復経口投与試験の無影響量は、20 mg/kg/day であることが明らかになっている⁴⁾。

今回、OECD 高生産量 (HPV) 既存化学物質の安全性点検の一環として、本被験物質のラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響を検索したので、その結果を報告する。なお、本試験は、以下の基準およびガイドラインに準拠して実施した。

- ・「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第 4 条に規定する試験施設について」(昭和 59 年 3 月 31 日 ; 環保業第 39 号、薬発第 229 号、59 基局第 85 号連名基準) 一部改正 (昭和 63 年 11 月 18 日 ; 環企研第 233 号、衛生 38、63 基局 823) に定める「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第 4 条に規定する試験施設に関する基準」
- ・「OECD Guideline for Testing of Chemicals, Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test」
- ・「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」
(総理府告示第 6 号 : 昭和 55 年 3 月 27 日)
- ・「動物実験に関する指針」
(財) 日本実験動物学会 : 昭和 62 年 5 月 22 日)

試験材料および方法

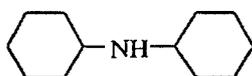
1. 被験物質および被験液の調製

1) 被験物質

被験物質であるジシクロヘキシルアミンは、
より提供された。被験物質の情報を以下に示した。

製造者 :
名称 : ジシクロヘキシルアミン
(CAS 番号 : 101-83-7)

構造式または示性式



ロット番号 :
純度 : 99.89%
性状 : 無色透明液体
分子量 : 181.3
比重 : 0.910/25℃
融点 : -0.1℃
沸点 : 255.8℃
保存方法 : 冷蔵 (開封後は窒素置換を行った)

なお、被験物質約 5g を保管試料として株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所被験物質保管室に保管し、動物試験終了後の残量は全て製造元の
に返却し、分析を実施した。その結果、本被験物質の品質に問題はなく、動物試験期間中の安定性が確認された (Attached Data 1)。

2) 被験液の調製

被験液の調製は、濃度毎に必要な量の被験物質を秤量し、コーンオイル (化学用、ナカライテスク株式会社、ロット番号 : V7R2020) に溶解し、所定量に調製した。本被験物質の 4 および 40mg/mL 濃度のコーンオイル溶液は、冷蔵 (約 4℃) ・遮光下 8 日間保存後、更に室温・遮光下 24 時間保存条件下で安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター

で確認されている (Attached Data 2) ことから、被験液の調製は、原則として週 1 回の頻度で行った。調製後の被験液は、1 日分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、使用までの間、冷蔵 (約 4℃)、遮光下で保存した。

被験液の濃度確認は、雌雄の投与開始前および雄の投与最終週の 2 回、投与に使用する各濃度の被験液について GC 法により株式会社ボゾリサーチセンターで実施した結果、表示値に対する割合は、いずれも 97~101%の範囲内であり、濃度は適切であった (Attached Data 3、4)。

2. 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット (Crj:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社) の雌雄各 60 匹 (入荷匹数: 雌雄各 62 匹) を 7 週齢で購入し、1 週間検疫・馴化飼育した後、雄は、一般状態に異常がなく、体重増加が良好な動物 48 匹を、雌は、搬入翌日から 5 日間、全動物の膣スミアを採取して性周期を観察し、正常な性周期を示し、雄と同様に一般状態に異常がなく、体重増加が良好な動物 48 匹を選びいずれも 8 週齢で投与を開始した。投与開始時の体重範囲は、雄で 306~335g、雌で 201~224g であった。なお、群構成後に余剰となった雄および性周期異常の雌は群構成終了後に、他の雌は、交配期間終了後にエーテル深麻酔により安楽死させた。

3. 飼育条件

動物は、検疫・馴化および動物試験期間を通して温度 23±3℃、相対湿度 50±20%、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の飼育室 (903 号室) で飼育した。

動物は、交配期間および妊娠 17 日から哺育 4 日までの期間を除きブラケット式金属製網ケージ (W 410 × D 350 × H 170 mm : リードエンジニアリング株式会社) を仕切板で 2 つに区切り、個別飼育した。交配期間中は上記ケージに雌雄各 1 匹の計 2 匹、また、妊娠 17 日から哺育 4 日までの期間は床敷 (ホワイトフレック : 日本チャールス・リバー株式会社) を入れたプラスチック製エコンケージ (W 340 x D 400 x H 185 mm : 日本クリア株式会社) に母児共に収容した。飼料は、固形飼料 NMF (放射線滅菌およびオートクレーブ滅菌 : オリエンタル酵母工業株式会社)、飲料水は、水道水 (御殿場市営水道水 : 自動給水装置使用) を自由に摂取させた。なお、プラスチック製エコンケージによる飼育期間中の給水は、給水瓶を用いて行った。

供試ロット飼料中の汚染物質および床敷中の汚染物質については、財団法人日本食品分析セ

ンターで分析を行いデータを入手し、また、飲料水については、水道法に準拠した水質の分析を財団法人静岡県生活科学検査センターに定期的（年4回）に依頼し、得られたデータを入手し、それぞれ異常のないことを確認して保管した。

4. 動物の識別およびケージへの表示

動物は、入荷時に耳標識をつけ個体識別を行い、補助識別として油性インクを用いて尾にマーキングした。また、飼育ケージには投与量（群）毎に色分けしたケージラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号および耳標識番号を明記した。

5. 投与量、群構成および動物数

投与量は、20、40 および 80mg/kg の3用量とし、対照群を加え4群とした。1群当たりの動物数は、雌雄各12匹とした。各群への動物の割り付けは、2.試験動物の項で示した基準で選んだ動物を群分け当日（投与開始当日）の体重により層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるようコンピュータを用いたブロック配置法および無作為抽出法の組合せ（ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群および群内の個体番号を無作為に割当て）により行った。群構成表を以下に示す。

群	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	12	1001～1012
				雌	12	1101～1112
低用量群	20	4	5	雄	12	2001～2012
				雌	12	2101～2112
中用量群	40	8	5	雄	12	3001～3012
				雌	12	3101～3112
高用量群	80	16	5	雄	12	4001～4012
				雌	12	4101～4112

6. 投与量の設定根拠

投与量は、ラットを用いて2週間反復経口投与した予備試験（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：U-1417、投与量：0、20、40、80 および 160mg/kg）の成績を参考にして決定した。すなわち、160mg/kg 投与群では雄5例中2例、雌5例中4例が死亡した。80mg/kg 投与群では死亡例は認められなかったが、一般状態観察において雌雄とも流涎が認められた。同群の体重および摂餌量は、雄には明らかな変化は認められなかったが、雌では体重増加抑制、摂餌量の低値傾向が認められた。しかし、雌の性周期、剖検所見および器官重量に被験物質投

与の影響は認められなかった。20 および 40mg/kg 投与群では、40mg/kg 投与群において流涎が認められた以外に明らかな被験物質投与の影響は認められなかった。したがって、本試験における高用量は雌の体重および摂餌量に被験物質投与の影響が認められたが、死亡例のなかった 80mg/kg とし、以下、公比 2 で除して中および低用量には 40 および 20mg/kg を設定した。

7. 投与経路、投与回数、投与方法および投与期間とその選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals, Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test に従い、経口投与を選択した。また、投与回数は 1 日 1 回とし、投与期間は上記ガイドラインに従い、雄は交配前 14 日間、その後剖検前日までの 49 日間、雌は交配前 14 日間、交配期間および妊娠期間を通して哺育 3 日までとした。

投与容量は、5mL/kg 体重とし、1 日 1 回（08:00～15:00 の間）、金属製胃ゾンテを用いて、強制経口投与した。対照群には媒体（コーンオイル）を同様に投与した。なお、投与時に分娩中の動物は分娩終了後に投与した。個体毎の投与液量は、雄は各測定日の体重、雌の交配前および交配期間中は各測定日の体重、妊娠期間中は妊娠 0 日、7 日、14 日および 21 日の体重、授乳期間中は哺育 0 日の体重を基準に算出した。

8. 観察、測定、検査の方法および頻度

1) 雄 (P)

(1) 一般状態の観察

一般状態の観察は、毎日、投与前、投与直後および投与 2 時間後の 3 回、体外表、栄養状態、行動などについて行った。但し、土曜および休日の観察は、投与前および投与直後の 2 回とした。

(2) 体重測定

体重は、投与第 1 日の投与前、投与第 4 日、8 日、11 日、15 日、22 日、29 日、36 日、43 日および剖検日（投与開始後 50 日）の 08:30～12:30 の間に測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配期間を除く体重測定日と同じ日の 08:30～12:30 の間に残餌量を測定し、前日の給餌量との差から 1 日摂取量を算出した。

(4) 剖検および器官重量測定

全例を最終投与の翌日に体重を測定した後、エーテル麻酔下で腹大動静脈より放血致死させ、剖検し、内部器官および組織を肉眼的に観察した。さらに、精巣および精巣上

体を採取し、重量測定後、ブアン液に固定した。また、剖検で異常が認められた器官・組織は、リン酸緩衝液（1/15M、pH7.1～7.4）で調製した10%ホルマリン液（以下、リン酸緩衝10%ホルマリン液と略）に固定し、保存した。

(5) 病理組織学検査

全例の精巣および精巣上体をパラフィン包埋し、対照群および高用量投与群について切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色、PAS染色を行い、鏡検した。

2) 雌 (P)

(1) 一般状態の観察

一般状態の観察は、毎日、投与前、投与直後および投与2時間後の3回、体外表、栄養状態、行動などについて行った。但し、土曜および休日の観察は、投与前および投与直後の2回とした。

(2) 体重測定

体重は、交配前投与期間については投与第1日の投与前、投与第4日、8日、11日および15日、妊娠期間中については妊娠0日、7日、14日および21日、哺育期間中については哺育0日および4日の08:30～12:30の間に測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配前投与期間については体重測定日と同じ日、妊娠期間中については妊娠1日、7日、14日および21日、哺育期間中については哺育1日および4日の08:30～12:30の間に残餌量を測定し、前日の給餌量との差から1日摂取量を算出した。

(4) 膣スメア検査

全例の雌について交配前投与期間中から交尾が成立するまで膣スメアを採取し、鏡検した。交配前投与期間中の膣スメア像は、発情前期、発情期、発情後期および発情休止期に分類し、発情期像発現回数および発情期から次の発情期までの日数（性周期）を調べた。なお、交配期間中は膣スメア内の精子の有無を調べた。

(5) 分娩および哺育観察

母動物は自然分娩させ、分娩異常の有無を観察した。分娩終了の確認は、妊娠21日から妊娠23日まで毎日行い、分娩が10:30までに終了していた場合、その日を哺育0日とした。10:30以降に分娩が終了した場合には翌日を哺育0日とした。分娩終了が確認された母動物については哺育4日まで出生児を哺育させ、巣作り、児集めおよび授乳の有無を指標にして哺育状態を観察した。

(6) 剖検

生存例については哺育4日に体重を測定した後、エーテル麻酔下で腹大動静脈より放血致死させ、剖検し、内部器官および組織を肉眼的に観察するとともに黄体数および着床痕数を調べた。さらに、卵巣、子宮および剖検で異常が認められた器官・組織は、リン酸緩衝10%ホルマリン液に固定し、保存した。また、妊娠期間中に死亡した80mg/kg投与群の2例(No.4102、4110)、全児が死産であったり、哺育期間中に全児が死亡した同群の6例(No.4101、4106、4108、4109、4111、4112)については、発見後、同様に剖検した。

(7) 病理組織学検査

全例の卵巣をパラフィン包埋し、対照群および高用量投与群について切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色を行い、鏡検した。

3) 親動物(P)の交配

被験物質を交配前14日間にわたって投与した後、同一群の雌雄を1対1の組み合わせで終夜同居させた。同居期間は、最長14日間として、交尾が確認されるまでとした。交尾の確認は、毎朝、膣栓形成あるいは膣スミア中に精子を確認したものを交尾成立とみなし、この日を妊娠0日とした。

4) 新生児(F1)

(1) 新生児の観察

哺育0日に生存児数、死産児数を数え、外表異常の有無を観察した。外表異常児は、リン酸緩衝10%ホルマリン液に固定し、保存した。生存児は性別を判定し、体重を測定した後に全例を母動物に哺育させた。また、死産児は、リン酸緩衝10%ホルマリン液に固定し、保存した。

(2) 哺育児の観察および測定

哺育児については、生死の観察を毎日1回行った。体重は生後0日(哺育0日)および4日に測定した。生後4日に全哺育児をエーテル麻酔下で放血致死させて剖検を行い、内部器官の異常の有無を調べた。

9. 統計処理

統計解析は、次の方法を用いて行い、有意水準は両側 5 および 1%とした。なお、新生児体重、着床率、分娩率、出生率および新生児生存率については母動物毎に平均値あるいは率を求めて検定した。また、誤投与と考えられた 20mg/kg 投与群の雌 1 例 (No.2106) のデータは交尾率および受胎率のデータを除いて集計から除外した。

1) 多重検定

Bartlett 法により各群の分散の均一性についての検定を行った。その結果、分散が均一の場合は一元配置法による分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合、Dunnnett 法を用いて対照群と各投与群との一対比較検定を行った。分散が均一でない場合は Kruskal-Wallis の順位検定を行い、有意であれば対照群と各投与群との平均順位の差について Dunnnett 型の検定を行った。

体重、摂餌量、発情期像発現回数、性周期、同居日数、妊娠期間、器官重量、黄体数、着床痕数、出生児数、性比、着床率、分娩率、出生率、新生児生存率

2) χ^2 検定

交尾率、受胎率、出産率

3) Mann-Whitney の U 検定

病理組織学検査における所見の発現頻度および程度の増強について行った。

4) 各種データの算出式

$$\text{交尾率 (\%)} = (\text{交尾確認動物数} / \text{交配動物数}) \times 100$$

$$\text{受胎率 (\%)} = (\text{妊娠動物数} / \text{交尾確認動物数}) \times 100$$

$$\text{出産率 (\%)} = (\text{生児出産母動物数} / \text{妊娠母動物数}) \times 100$$

$$\text{妊娠期間 (日)} = \text{哺育 0 日 (分娩確認日)} - \text{妊娠 0 日}$$

$$\text{性 比} = \text{雄} / (\text{雄} + \text{雌})$$

$$\text{新生児生存率 (\%)} = (\text{哺育 4 日の生存児数} / \text{哺育 0 日の生児数}) \times 100$$

$$\text{分娩率 (\%)} = (\text{総出産児数} / \text{着床痕数}) \times 100$$

$$\text{出生率 (\%)} = (\text{哺育 0 日の生存児数} / \text{総出産児数}) \times 100$$

$$\text{着床率 (\%)} = (\text{着床痕数} / \text{黄体数}) \times 100$$

試験結果

I. 反復投与毒性

1. 雄 (P) に及ぼす影響

1) 一般状態 (Table 1, 2, Appendix 1~8)

40mg/kg 以下の投与群には一般状態の変化は認められなかった。80mg/kg 投与群では投与直後に流涎が 12 例中 11 例 (No. 4008 を除く全例) において投与第 7 日以降、一時的あるいは継続して観察された。しかし、同群では他の神経症状が認められていないため、流涎は被験物質投与の影響とは判断しなかった。

2) 体重 (Figure 1, Table 3, Appendix 9~12)

40mg/kg 以下の投与群における各測定日の体重および体重増加量は、対照群と同等の値を示し、被験物質投与の影響は認められなかった。80mg/kg 投与群では体重増加が抑制され、投与第 29 日および最終投与翌日 (投与開始後 50 日) の測定値ならびに体重増加量に対照群との間に有意な差が認められた。

3) 摂餌量 (Figure 2, Table 4, Appendix 13~16)

80mg/kg 投与群における投与第 22 日の摂餌量に有意な低値が認められたが、被験物質投与群における摂餌量は、全体を通して対照群と同等の値を示し、被験物質投与の影響は認められなかった。

4) 剖検所見 (Table 5, Appendix 17~20)

偶発所見と考えられる肺の暗赤色点が 80mg/kg 投与群の 1 例 (No. 4001) に認められた以外、いずれの例においても内部器官および組織の肉眼的な異常は観察されなかった。

5) 器官重量 (Table 6, 7, Appendix 21~28)

精巣および精巣上体の絶対重量には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。相対重量では 80mg/kg 投与群における精巣重量が高値を示し、右側および両側の重量に有意な差が認められた。なお、同群における精巣重量の相対重量の高値は、最終体重の低値に起因した変化であると考えられた。

6) 病理組織学検査 (Table 8, Appendix 29, 30)

対照群および 80mg/kg 投与群について実施した精巣および精巣上体の検索では、精巣に軽微な精子停滞、精巣上体管腔内の精子減少および崩壊細胞が対照群および 80mg/kg 投与群に各 1 例 (対照群 : No. 1005、80mg/kg 投与群 : No. 4012)、精巣上体に軽度な精子肉芽腫が 80mg/kg 投与群に 1 例 (No. 4006) 認められたが、組織学的性状から偶発性変化と考えられた。

2. 雌 (P) に及ぼす影響

1) 一般状態 (Table 9~11, Appendix 31~42)

40mg/kg 以下の投与群では、交配前投与期間、交配期間、妊娠期間および哺育期間を通じて一般状態の変化は認められなかった。80mg/kg 投与群では妊娠 21 日および 22 日に各 1 例 (No. 4102, 4110) が死亡した。一般状態の変化として、投与直後に流産が全例において投与第 8 日以降、哺育 3 日までの間に一時的あるいは継続して観察され、死亡例 1 例 (No. 4102) では死亡前 (妊娠 22 日) に粗毛も記録された。しかし、同群では流産以外の神経症状が認められていないため、流産は被験物質投与の影響とは判断しなかった。その他、一般状態の変化として妊娠 22 日の分娩終了後の投与 2 時間後に腹臥姿勢、呼吸数減少、体温低下、出生児の児集め不良が 1 例 (No. 4108) に記録された。同群の哺育期間中における一般状態の変化として、粗毛が 2 例 (No. 4108, 4111)、児集め不良が 7 例 (No. 4101, 4104, 4106, 4107, 4108, 4109, 4112) に認められた。

なお、表には示さなかったが 20mg/kg 投与群の 1 例 (No. 2106) において喘鳴が投与第 12 日から 15 日に認められ、剖検では胸腔内に白色物の貯留が観察されたため、同例では誤投与があったものと考えられた。

2) 体重 (Figure 3, Table 12, 13, Appendix 43~50)

40mg/kg 以下の投与群における交配前投与期間、妊娠期間および哺育期間の各測定日の体重および体重増加量は、対照群と同等の値を示し、被験物質投与の影響は認められなかった。80mg/kg 投与群では体重増加が抑制され、投与第 4 日、8 日および 11 日、妊娠 21 日および哺育 4 日の測定値に対照群との間に有意な差が認められた。また、各期間における体重増加量も低値を示し、妊娠期間の体重増加量に対照群との間に有意な差が認められた。

3) 摂餌量 (Figure 4, Table 14, 15, Appendix 51~58)

40mg/kg 以下の投与群における交配前投与期間、妊娠期間および哺育期間の摂餌量は、妊娠 1 日に有意な低値が認められたが、全体を通して対照群と同等の値を示し、被験物質投与の影響は認められなかった。80mg/kg 投与群の摂餌量は、対照群と比べて低値を示す日があり、交配前投与期間では投与第 4 日、11 日および 15 日、妊娠期間では妊娠 1 日および 21 日、哺育期間では哺育 1 日および 4 日に対照群との間に有意な差が認められた。なお、同群における摂餌量の低下は、哺育期に顕著に認められた。

4) 剖検所見 (Table 16, Appendix 59~62)

妊娠 22 日に死亡した 80mg/kg 投与群の 1 例 (No.4102) において横隔膜ヘルニア、腺胃に暗赤色点が認められ、外部所見では粗毛が記録された。その他、いずれの例においても内部器官および組織の肉眼的な異常は観察されなかった。なお、上記の死亡例でみられた所見は同群の他の例では認められていない所見であること、あるいは先天的な異常であることから、偶発所見と判断した。

5) 病理組織学検査 (Table 17, Appendix 63, 64)

対照群および 80mg/kg 投与群について実施した卵巢の検索では、いずれの例においても異常所見は認められなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物 (P) に及ぼす影響

1) 性周期 (Table 18, Appendix 65~68)

被験物質投与群における性周期、すなわち発情期像発現回数および発情期から次の発情期までの日数は対照群と同等であり、有意な差は認められなかった。

2) 交尾率および受胎率 (Table 19, Appendix 69~72)

交尾は、対照群および被験物質投与群のいずれの例においても同居開始後 4 日以内に成立し、各群の交尾率は 100%であった。また、交尾成立までに要した平均日数には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

妊娠は対照群および被験物質投与群の全例で成立し、各群の受胎率は 100%であった。

3) 妊娠期間、分娩および哺育状況 (Table 20、Appendix 73~76)

被験物質投与群における妊娠期間は、対照群とほぼ同等であり、有意な差は認められなかった。分娩異常は、対照群および被験物質投与群のいずれにも認められなかった。哺育状況では、40mg/kg 以下の投与群に異常は認められなかった。しかし、80mg/kg 投与群では前述の如く、7例 (No.4101、4104、4106、4107、4108、4109、4112) に児集め不良が認められた。

4) 生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率 (Table 20、Appendix 73~76)

生児出産雌数は、対照群、20 および 40mg/kg 投与群では全例、80mg/kg 投与群では 10 例中 9 例であり、出産率には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。また、黄体数、着床痕数および着床率に対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

2. 新生児 (F1) に及ぼす影響

1) 生存児数、死産児数、分娩率および出生率 (Table 20、Appendix 73~76)

40mg/kg 以下の投与群における生存児数、死産児数および出生率には対照群との間に有意な差は認められなかった。一方、80mg/kg 投与群では死産児数の有意な高値、生存児数の有意な低値、出生率の有意な低値が認められた。分娩率には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

2) 性比、外表異常および生存性 (Table 21、Appendix 77~80)

性比には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。新生児の外表異常として、痕跡尾および鎖肛が 40mg/kg 投与群の 1 母体 (No. 3101) に 1 例観察されたのみであった。

40mg/kg 以下の投与群における新生児生存率には対照群との間に有意な差は認められなかった。一方、80mg/kg 投与群では哺育期の死亡が多く、哺育 4 日までに生存児を有していた母動物は 9 例中 4 例のみであった。したがって、同群における新生児生存率は、著しく低く、対照群との間に有意な差が認められた。

3) 体重 (Table 22、Appendix 81~84)

40mg/kg 以下の投与群における生後 0 日および 4 日の体重は、雌雄ともに対照群とほぼ同等の値を示し、有意な差は認められなかった。80mg/kg 投与群における生後 0 日および 4 日の体重は、雌雄ともに低値を示し、生後 0 日に対照群との間に有意な差が認められた。

4) 剖検所見 (Table 23、Appendix 85~88)

生後 4 日に実施した剖検では、胸腺の頸部遺残、脾臓の位置異常、大動脈弓から分岐する動脈の分岐異常あるいは膀胱に結節の所見が対照群、20 および 40mg/kg 投与群の少数例に認められたが、80mg/kg 投与群にはこれらの所見は観察されなかった。

考 察

ジシクロヘキシルアミンの 0 (対照群)、20、40 および 80mg/kg を 1 群雌雄各 12 匹の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crj:CD(SD)] に、雄には交配前 14 日間および交配期間中を経て剖検前日まで、雌には交配前 14 日間、交配期間、妊娠期間および分娩を経て哺育 3 日まで投与する簡易生殖毒性試験を実施した。

雄 (P) では、80mg/kg 投与群において体重増加が抑制された。しかし、同群の一般状態、摂餌量、剖検所見、精巣および精巣上体重量ならびにこれら器官の病理組織学検査所見に被験物質投与の影響は認められなかった。一方、40 mg/kg 以下の投与群には一般状態、体重、摂餌量、剖検所見、精巣および精巣上体重量に被験物質投与の影響は認められなかった。

雌 (P) では、80mg/kg 投与群において妊娠 21 日および 22 日に各 1 例が死亡した。また、被験物質投与による一般状態の変化として、死亡例 1 例に粗毛が、生存例 1 例では妊娠 22 日の分娩終了後に腹臥姿勢、呼吸数減少、体温低下、出生児の児集め不良が記録された。また、同群の哺育期間中における一般状態の変化として、粗毛、児集め不良が認められた。さらに、同群では、体重増加が抑制され、交配前投与期間、妊娠期間および哺育期間の各期間における体重増加量および摂餌量が低値を示した。しかし、同群の剖検所見および卵巣の病理組織学検査所見に被験物質投与の影響は認められなかった。一方、40mg/kg 以下の投与群には一般状態、体重、摂餌量および剖検所見には被験物質投与の影響は認められなかった。

以上、80mg/kg 投与群では雌 2 匹が死亡し、雌雄に体重増加抑制、雌に摂餌量の低下が認められた。したがって、雌雄の一般毒性学的な無影響量は、40mg/kg/day であると考えられた。

親動物 (P) の生殖発生毒性に関して、雌の性周期に及ぼす被験物質投与の影響は認められず、雌雄の交尾および受胎に及ぼす被験物質投与の影響ならびに妊娠期間に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。また、分娩異常は、対照群および被験物質投与群のいずれにも認められなかった。哺育状況では、80mg/kg 投与群において児集め不良の母動物が多く認められ、哺育 4 日までに生存児を有していた母動物は 4 例のみであった。しかし、40mg/kg 以下の投与群に哺育異常は認められなかった。一方、生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率に被験物質投与の影響は認められなかった。

新生児に関して、80mg/kg 投与群では死産児数の有意な高値、生存児数の有意な低値、出生

率の有意な低値が認められた。しかし、40mg/kg 以下の投与群には生存児数、死産児数および出生率に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。また、分娩率にはいずれの投与群においても被験物質投与の影響は認められなかった。

新生児の性比に被験物質投与の影響は認められず、被験物質投与に起因する外表異常は認められなかった。哺育期間中の児の死亡は、80mg/kg 投与群において多く、同群の新生児生存率は、著しい低値を示した。しかし、40mg/kg 以下の投与群における新生児生存率には被験物質投与の影響は認められなかった。新生児の体重は、80mg/kg 投与群において雌雄とも生後0日および4日に低値を示したが、40mg/kg 以下の投与群における体重には被験物質投与の影響は認められなかった。哺育児の生後4日の剖検では被験物質投与に起因すると考えられる異常は認められなかった。

以上、いずれの投与群においても性周期、交尾および受胎、妊娠期間および分娩に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。しかし、80mg/kg 投与群では哺育期の児集め不良の母動物が多く認められ、新生児の生存および発育に及ぼす被験物質投与の影響が認められた。したがって、生殖発生学的な無影響量は、雄に関しては80mg/kg/day、雌に関しては40mg/kg/day、新生児に関しては40mg/kg/day であると考えられた。

参考文献

- 1) Hickman, J. A., Mottram, D. R. and Kidman, C.:
Comparative study of propranolol and dicyclohexylamine protection of α -receptor blockade. Arch. Int. Pharmacodyn. 228, 191 - 195, 1979
- 2) Mottram, D. R. and Hickman, J. A.:
Studies on the modes of action of dicyclohexylamine and related amines with a potentiating effect on noradrenakine responses in the rat vas deferens. Arch. Int. Pharmacodyn. 242, 50 - 58, 1979
- 3) Kidman, C., Mottram, D. R. and Hickman, J. A.:
Potentiation of the response of rat vas deferens to noradrenaline by dicyclohexylamine and related amine. Arch. Int. Pharmacodyn. 228, 180 - 186, 1979
- 4)
ジシクロヘキシルアミンのラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験 (回復 14 日間)
化学物質毒性試験報告、Vol. 6、 1998 (投稿中)

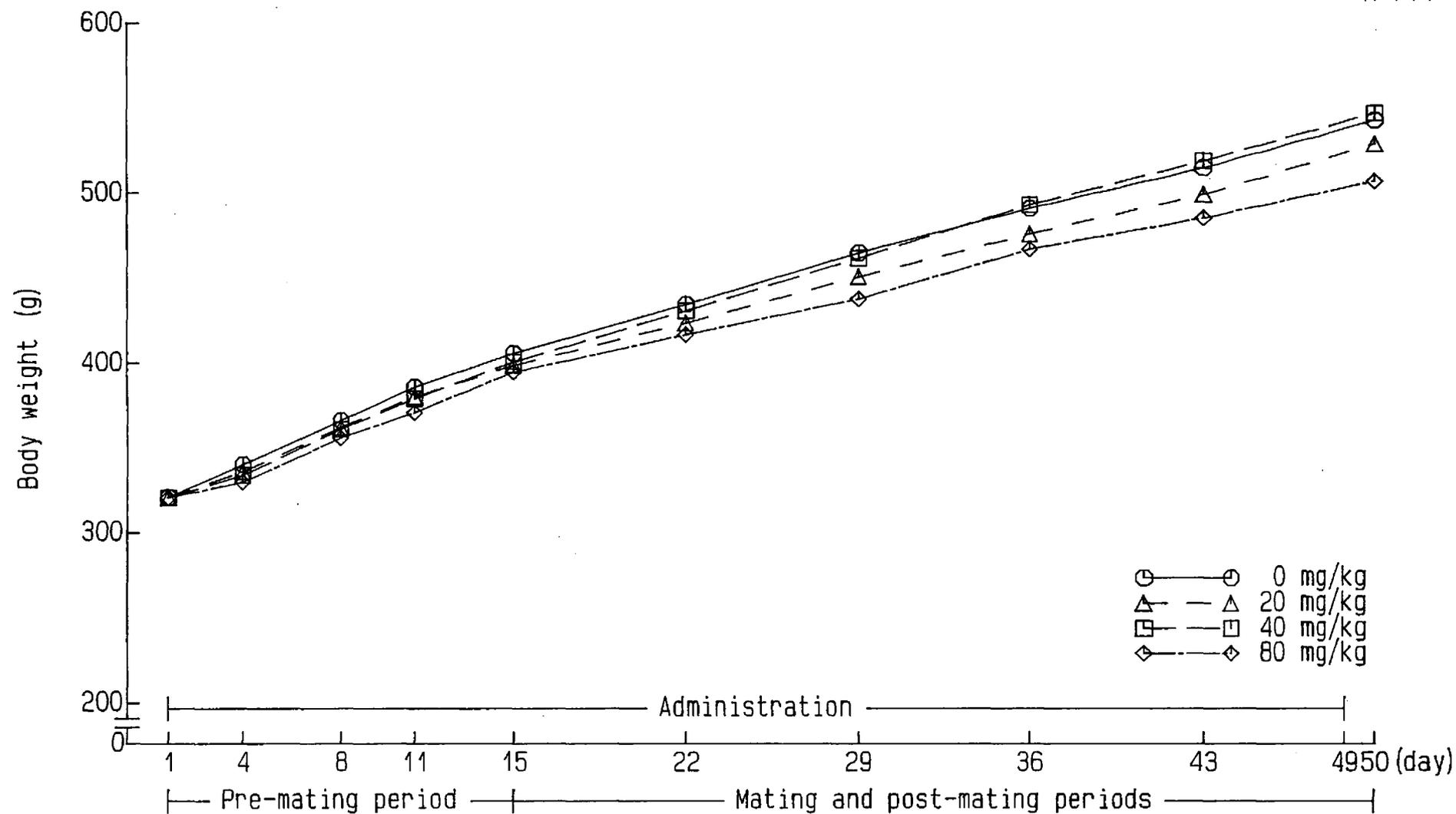


Figure 1 Body weight changes of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

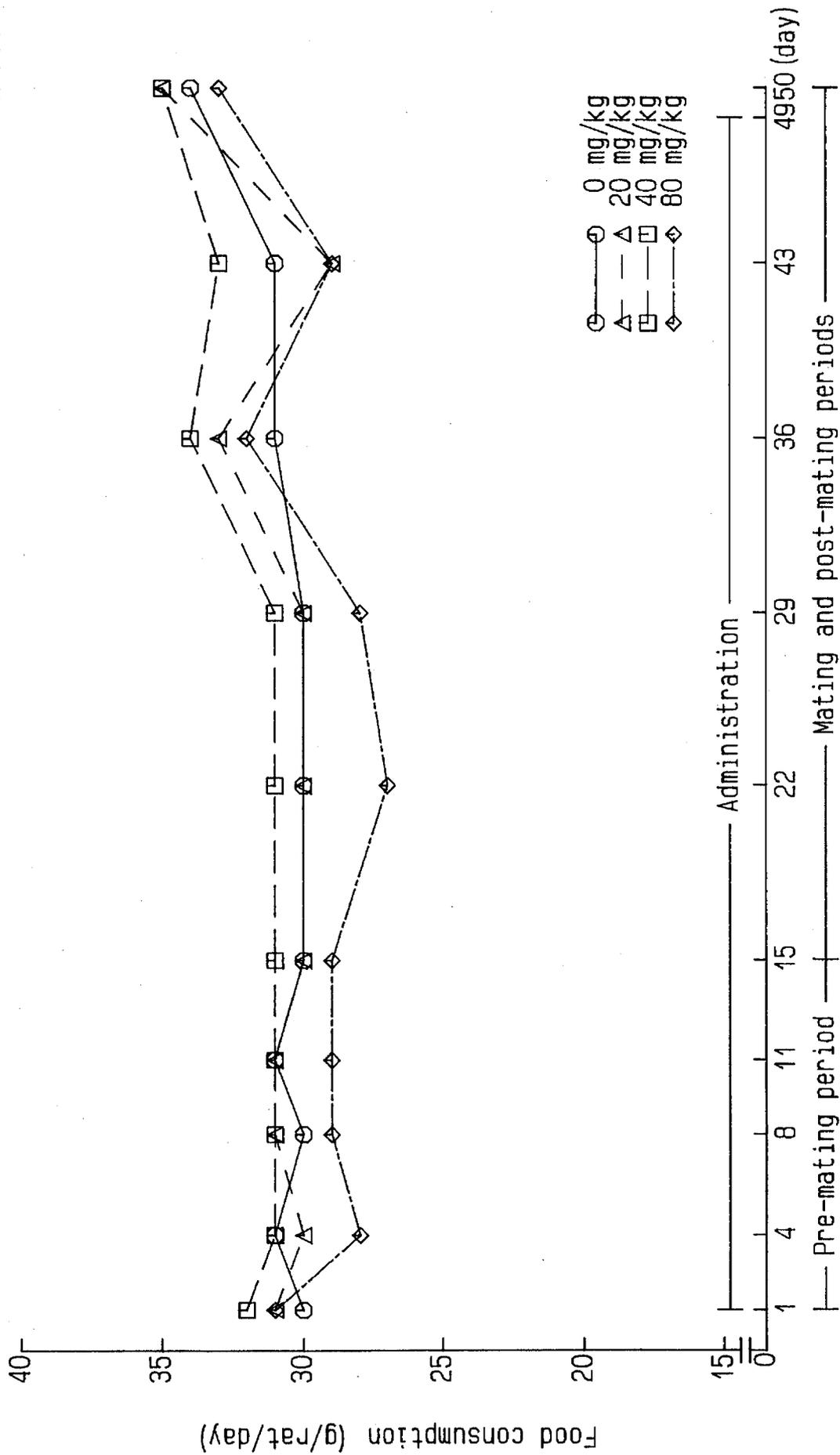


Figure 2 Food consumption of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

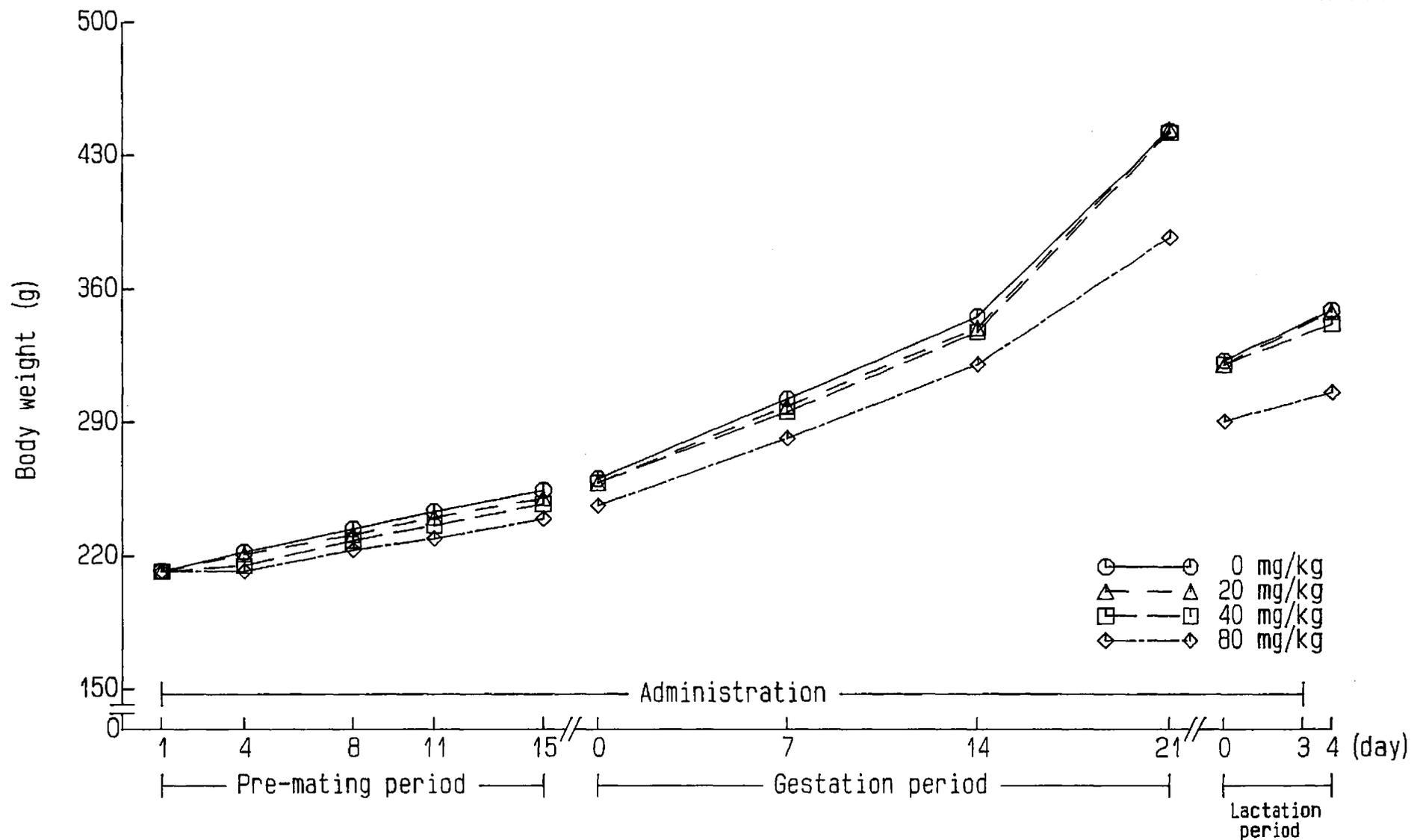


Figure 3 Body weight changes of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

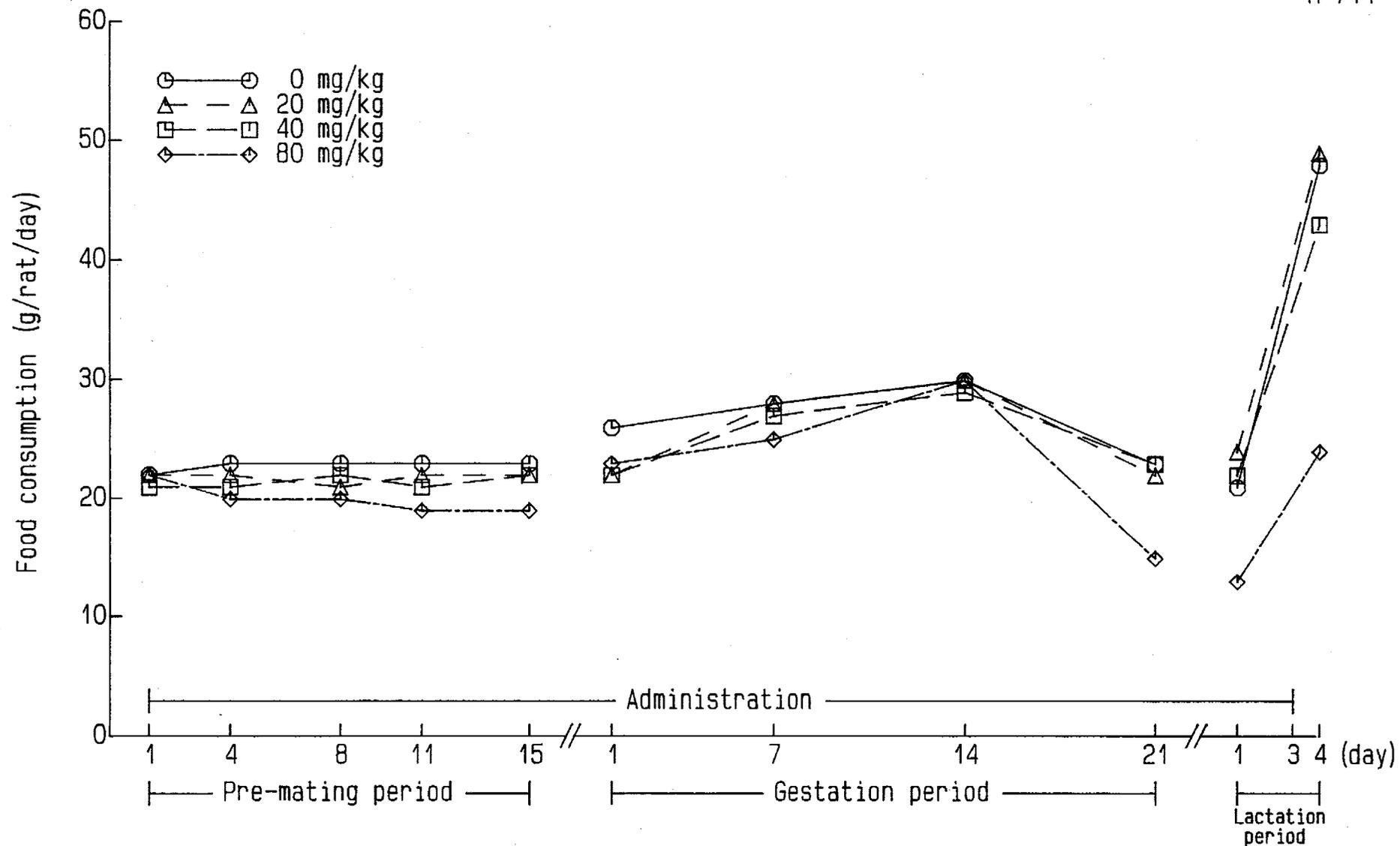


Figure 4 Food consumption of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Table 1 Clinical signs of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg	Findings	Day of administration																								
		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
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	2	2	3	3	0	2	2	2	2	1	2	2	3	3	3
	Salivation	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	2	2	3	3	0	2	2	2	2	1	2	2	3	3	3

* : Commencement of pairing

Table 2 Clinical signs of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg	Findings	Day of administration																								
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50a)
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	4	5	3	3	3	3	3	5	3	2	4	3	2	2	2	3	2	3	2	3	2	2	3	2	0
	Salivation	4	5	3	3	3	3	3	5	3	2	4	3	2	2	2	3	2	3	2	3	2	2	3	2	0

a): Autopsy day

Table 3 Body weights of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration										Gain 1-50
		1	4	8	11	15	22	29	36	43	50	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	321	340	366	386	406	435	465	491	515	543	222
	S.D.	8	9	11	14	16	18	21	23	24	30	26
20	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	321	336	362	380	399	424	451	476	499	529	208
	S.D.	8	8	13	16	17	19	22	24	29	31	24
40	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	321	334	361	379	401	431	462	493	519	547	226
	S.D.	9	12	16	20	25	26	29	30	37	40	34
80	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	321	330	356	371	395	417	438*	467	485	507*	187*
	S.D.	9	9	11	11	15	18	20	24	29	34	32

Unit : g

No.: No. of animals

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

Table 4 Food consumption of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration									
		1	4	8	11	15	22	29	36	43	50
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	30	31	30	31	30	30	30	31	31	34
	S.D.	1	4	3	3	4	4	3	3	4	3
20	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	31	30	31	31	30	30	30	33	29	35
	S.D.	2	3	3	3	2	3	2	4	5	3
40	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	32	31	31	31	31	31	31	34	33	35
	S.D.	3	3	4	4	4	2	3	2	4	3
80	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	31	28	29	29	29	27*	28	32	29	33
	S.D.	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3

Unit : g/rat/day

No. : No. of animals

* : $p < 0.05$ (Significant difference from control group)

Table 5 Gross pathological findings of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose (mg/kg)	0	20	40	80
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of animals with abnormal findings (%)	0	0	0	1 (8.3)
Lung Dark red spot	0	0	0	1 (8.3)

Table 6 Absolute organ weights of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		Body weight g	Testis			Epididymis		
				(R) g	(L) g	(R+L) g	(R) mg	(L) mg	(R+L) mg
0	12	Mean	543	1.64	1.65	3.29	585	567	1152
		S.D.	30	0.13	0.11	0.24	65	61	122
20	12	Mean	529	1.68	1.70	3.38	575	562	1137
		S.D.	31	0.10	0.10	0.19	62	63	119
40	12	Mean	547	1.70	1.70	3.40	601	587	1187
		S.D.	40	0.15	0.14	0.28	45	44	77
80	12	Mean	507*	1.72	1.70	3.42	600	581	1180
		S.D.	34	0.14	0.14	0.27	49	65	113

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

Table 7 Relative organ weights of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		Testis			Epididymis		
			(R) g%	(L) g%	(R+L) g%	(R) mg%	(L) mg%	(R+L) mg%
0	12	Mean	0.30	0.31	0.61	108	105	213
		S.D.	0.03	0.02	0.05	15	13	28
20	12	Mean	0.32	0.32	0.64	109	107	216
		S.D.	0.02	0.03	0.05	12	14	25
40	12	Mean	0.31	0.31	0.62	110	108	218
		S.D.	0.03	0.03	0.06	12	12	23
80	12	Mean	0.34**	0.34	0.68*	119	115	234
		S.D.	0.03	0.03	0.07	13	16	28

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 8 Histopathological findings of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Organs -findings	Dose (mg/kg)	0									80								
		No. of animals Grade									No. of animals Grade								
		0	1	2	3	4	P	Obs	TE	0	1	2	3	4	P	Obs	TE		
Testis																			
-retention, sperm		11	1					1	12	11	1					1	12		
Epididymis																			
-decrease, sperm		11	1					1	12	11	1					1	12		
-cell debris, lumen		11	1					1	12	11	1					1	12		
-granuloma, sperm		12							12	11		1				1	12		

0 : No remarkable changes 1 : Slight 2 : Mild 3 : Moderate 4 : Severe
 P : Present (used when grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion)
 Obs : Observed number
 TE : Total Examined

No significant difference from control group.

Table 9

Clinical signs of female rats during the pre-mating and mating periods in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg	Findings	Day of administration																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	18
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	6	2
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	No. of animals	11 ^{a)}	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	8	4	0
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	6	3
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	7	4
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1	2	2	2	2	1	1	1	0
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1	2	2	2	2	1	1	1	0

* : Commencement of pairing

a): Findings from 1 animal were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

Table 10 Clinical signs of dams during the gestation period in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg	Findings	Day of gestation																						
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20	No. of dams	11 ^{a)}	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	7	
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
40	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
80	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	
	No. of dams with abnormal findings	1	3	3	2	3	4	4	2	3	3	2	4	4	3	6	6	5	4	2	1	3	4	3
	Salivation	1	3	3	2	3	4	4	2	3	3	2	4	4	3	6	6	5	4	2	1	3	3	1
	Unkempt fur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Oligopnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Poor retrieving	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

a): Findings from 1 dam were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

Table 11 Clinical signs of dams during the lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg	Findings	Day of lactation				
		0	1	2	3	4
0	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
20	No. of dams	11 ^{a)}	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
40	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
80	No. of dams	10	9 ^{b)}	6 ^{c)}	5 ^{d)}	4 ^{e)}
	No. of dams with abnormal findings	7	5	3	1	0
	Salivation	2	3	2	1	0
	Unkempt fur	2	1	0	0	0
	Poor retrieving	4	4	1	0	0

a): Findings from 1 dam were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

b): One dam was necropsied on day 0 of lactation because all pups were stillborn.

c): Three dams were necropsied on day 1 of lactation because all pups died.

d): One dam was necropsied on day 2 of lactation because all pups died.

e): One dam was necropsied on day 3 of lactation because all pups died.

Table 12 Body weights of female rats during the pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration					Gain 1-15
		1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	212	222	234	243	254	42
	S.D.	6	9	12	13	16	14
20	No.	11 ^{a)}	11	11	11	11	11
	Mean	212	221	231	240	250	37
	S.D.	6	10	10	12	15	13
40	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	212	215	228	236	247	35
	S.D.	6	7	7	9	11	11
80	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	212	212*	223*	229*	239	27
	S.D.	6	6	7	10	13	12

Unit : g

No.: No. of animals

a) : Data from 1 animal were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

* : $p < 0.05$ (Significant difference from control group)

Table 13

Body weights of dams during the gestation and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg		Day of gestation				Gain 0-21	Day of lactation		Gain 0-4
		0	7	14	21		0	4	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	260	302	345	442	182	322	348	26
	S.D.	18	22	26	43	30	39	27	15
20	No.	11 ^{a)}	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	258	298	339	443	185	320	347	27
	S.D.	14	20	25	32	22	27	25	17
40	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	258	295	337	441	182	320	341	21
	S.D.	8	9	12	21	21	13	18	13
80	No.	12	12	12	11 ^{b)}	11	10 ^{c)}	4 ^{d)}	4
	Mean	246	281	320	386**	142**	290	305**	13
	S.D.	13	18	24	29	21	28	21	8

Unit : g

No.: No. of dams

a) : Data from 1 dam were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

b) : One dam died on day 21 of gestation.

c) : One dam died on day 22 of gestation.

d) : Six dams were necropsied from days 0 to 3 of lactation because all pups died or all pups were stillborn.

** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 14 Food consumption of female rats during the pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration				
		1	4	8	11	15
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	22	23	23	23	23
	S.D.	2	3	3	2	3
20	No.	11 ^{a)}	11	11	11	11
	Mean	22	22	21	22	22
	S.D.	1	3	3	3	2
40	No.	12	12	12	12	12
	Mean	21	21	22	21	22
	S.D.	2	2	3	4	3
80	No.	12	12	12	12	12
	Mean	22	20*	20	19**	19**
	S.D.	2	3	2	2	4

Unit : g/rat/day

No.: No. of animals

a) : Data from 1 animal were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 15

Food consumption of dams during the gestation and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg		Day of gestation				Day of lactation	
		1	7	14	21	1	4
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	26	28	30	23	21	48
	S.D.	3	5	3	5	9	10
20	No.	11 ^{a)}	11	11	11	11	11
	Mean	22*	28	30	22	24	49
	S.D.	2	4	4	4	5	6
40	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	22*	27	29	23	22	43
	S.D.	2	2	2	3	5	6
80	No.	12	12	12	11 ^{b)}	9 ^{c)}	4 ^{d)}
	Mean	23*	25	30	15**	13*	24**
	S.D.	4	3	5	6	7	2

Unit : g/rat/day

No.: No. of dams

a) : Data from 1 dam were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

b) : One dam died on day 21 of gestation.

c) : One dam died on day 22 of gestation and one dam was necropsied on day 0 of lactation because all pups were stillborn.

d) : Five dams were necropsied by day 3 of lactation because all pups died.

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 16 Gross pathological findings of dams in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose (mg/kg)	0	20	40	80
No. of dams examined	12	11a)	12	12
No. of dams with abnormal findings	0	0	0	1b)
Diaphragmatic hernia	0	0	0	1
Stomach				
Dark red spots in glandular stomach	0	0	0	1
External appearance				
Unkempt fur	0	0	0	1

a): Finding from 1 dam was excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

b): Findings from 1 dam which died on day 22 of gestation

Table 17 Histopathological findings of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Organs -findings	Dose (mg/kg)	0								80							
		No. of animals								No. of animals							
	Grade	0	1	2	3	4	P	Obs	TE	0	1	2	3	4	P	Obs	TE
Ovary		12							12	12							12

0 : No remarkable changes 1 : Slight 2 : Mild 3 : Moderate 4 : Severe
P : Present (used when grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion)
Obs : Observed number
TE : Total Examined

Table 18

Estrous cycle in female rats during the pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus					Mean±S.D.	Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4		
0	12	0	0	1	8	3	3.2±0.6	4.3±0.4
20	11a)	0	0	0	8	3	3.3±0.5	4.1±0.2
40	12	0	0	0	10	2	3.2±0.4	4.4±0.5
80	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5	4.3±0.4

a): Data from 1 animal were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.
No significant difference from control group in any treated groups.

Table 19

Reproductive performance of male and female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg	No. of males	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) b)
0	12	12	2.3±1.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)
20	12c)	12c)	2.0±0.9	12/12(100.0)	12/12(100.0)
40	12	12	2.6±1.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)
80	12	12	2.6±1.3	12/12(100.0)	12/12(100.0)

a): (No. of pairs with successful copulation / No. of pairs mated) X 100

b): (No. of pregnant animals / No. of pairs with successful copulation) X 100

c): One male was mated with female which intubation error was suspected during the period prior to mating.

No significant difference from control group in any treated groups.

Table 20 Findings of delivery on dams in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females with live pups	Gestation index % a)	Gestation length	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index % b)	No. of still-born	No. of live born	Live birth index % c)	Delivery index % d)
0	Total	12	12	100.0		214	194		11	169		
	Mean				22.8	17.8	16.2	89.0	0.9	14.1	94.9	93.2
	S.D.				0.5	3.1	4.5	14.1	1.6	3.7	8.3	7.0
20	Total	11e)	11	100.0		191	181		1	166		
	Mean				22.6	17.4	16.5	94.9	0.1	15.1	99.5	92.4
	S.D.				0.5	3.5	3.2	6.2	0.3	3.3	1.6	9.2
40	Total	12	12	100.0		217	202		2	178		
	Mean				22.4	18.1	16.8	92.9	0.2	14.8	99.0	89.2
	S.D.				0.5	2.5	2.9	6.9	0.4	2.5	2.4	7.4
80	Total	10f)	9	90.0		163	143		55	72		
	Mean				22.6	16.3	14.3	86.5	5.5**	7.2**	58.5**	90.2
	S.D.				0.5	2.6	4.0	17.7	5.8	5.7	38.9	14.1

a): (No. of females with live pups / No. of pregnant females) X 100

b): (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) X 100

c): (No. of live pups on day 0 / No. of pups born) X 100

d): (No. of pups born / No. of implantation sites) X 100

e): Data from 1 dam were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

f): One dam each died on day 21 and day 22 of gestation, respectively, and 1 dam was sacrificed on day 0 of lactation because all pups were stillborn.

** : p<0.01 (Significant difference from control group)

Table 21 Findings of pups in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg	No. of dams		No. of males	No. of females	Sex ratio a)	External malformations (%)c)	Day 0	Day 4	Viability index % d)
							No. of live pups	No. of live pups	
0	12	Total	79	90		0	169	167	
		Mean	6.6	7.5	0.49	(0.0)	14.1	13.9	99.0
		S.D.	2.5	4.0	0.18	(0.0)	3.7	3.5	2.3
20	11e)	Total	88	78		0	166	165	
		Mean	8.0	7.1	0.54	(0.0)	15.1	15.0	99.4
		S.D.	2.5	3.3	0.15	(0.0)	3.3	3.3	2.0
40	12	Total	88	90		1f)	177g)	173	
		Mean	7.3	7.5	0.50	(0.9)	14.8	14.4	97.8
		S.D.	2.4	2.5	0.15	(3.2)	2.7	2.7	3.3
80	9	Total	38	34		0	72	20	
		Mean	4.2	3.8	0.50	(0.0)	8.0	2.2	20.8**
		S.D.	3.0	2.6	0.28	(0.0)	5.4	3.2	27.8

a): No. of males / No. of live born pups

b): No. of live born pups with external malformations

c): (No. of live born pups with external malformations / No. of live born pups) × 100

d): (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0) × 100

e): Data from 1 dam were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

f): Vestigial tail and anal atresia

g): One pup with external malformation was excluded.

** : p<0.01 (Significant difference from control group)

Table 22

Body weights of pups in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose mg/kg		Male		Female	
		0	4	0	4a)
0	No.	12	12	12	12
	Mean	7.3	11.8	7.0	11.1
	S.D.	0.8	2.0	0.8	1.9
20	No.	11 ^{b)}	11 ^{b)}	11 ^{b)}	11 ^{b)}
	Mean	7.0	11.3	6.7	10.6
	S.D.	0.8	2.0	0.8	1.8
40	No.	12	12	12	12
	Mean	6.8	11.0	6.5	10.4
	S.D.	0.5	1.3	0.5	1.6
80	No.	8 ^{c)}	4 ^{d)}	8 ^{c)}	4 ^{d)}
	Mean	6.1**	9.0	5.5**	8.6
	S.D.	0.6	0.7	0.6	1.1

Unit : g

No.: No. of dams

a) : Day after birth

b) : Data from 1 dam were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.

c) : All pups from 1 dam were stillborn.

d) : All pups from 4 dams died by day 3 after birth.

** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 23 Gross pathological findings of pups in preliminary reproduction toxicity screening test of dicyclohexylamine by oral administration

Dose (mg/kg)	0	20	40	80
Male				
No. of pups examined	78	87a)	87	12
No. of pups with abnormal findings (%)	2 (2.6)	2 (2.3)	1 (1.1)	0
Thymic remnant in neck	1 (1.3)	1 (1.1)	1 (1.1)	0
Malposition of spleen	0	1 (1.1)	0	0
Nodule in urinary bladder	1 (1.3)	0	0	0
Female				
No. of pups examined	89	78a)	86	8
No. of pups with abnormal findings (%)	0	2 (2.6)	2 (2.3)	0
Thymic remnant in neck	0	1 (1.3)	1 (1.2)	0
Abnormal bifurcation of artery from aortic arch	0	1 (1.3)	0	0
Nodule in urinary bladder	0	0	1 (1.2)	0

a): Findings from 1 dam were excluded because dosing on day 12 of administration was impossible and intubation error was suspected from clinical signs and gross pathological findings.