

R-1061

最 終 報 告 書

試験表題：N-エチルアニリンのラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：R-1061

試験期間：2010年7月14日~2011年6月17日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1. 目次	3
3. 要約	10
3.1 反復投与毒性	10
3.2 生殖発生毒性	10
4. 緒言	11
5. 試験材料及び方法	12
5.1 被験物質及び媒体	12
5.1.1 被験物質	12
5.1.2 媒体	13
5.2 投与液の調製及び保存方法	13
5.2.1 対照群投与液の採取	13
5.2.2 被験液の調製及び保存	13
5.2.3 被験液の安定性	14
5.2.4 被験液の濃度確認	14
5.3 試験動物種及び系統の選択理由	17
5.4 試験動物	17
5.5 飼育条件	17
5.6 動物の識別	18
5.7 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由	18

5.8	投与方法	18
5.9	投与量及び群構成	19
5.10	投与量の設定根拠	19
5.11	観察及び検査の方法	19
5.11.1	一般状態の観察	20
5.11.2	体重測定	20
5.11.3	摂餌量測定	20
5.11.4	膣垢検査	20
5.11.5	交配方法	20
5.11.6	分娩及び哺育観察	20
5.11.7	病理学検査	21
5.12	統計解析	22
5.12.1	パラメータの算出	22
5.12.2	検定	22
6.	試験結果	24
6.1	一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)	24
6.2	体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)	24
6.3	摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)	24
6.4	器官重量 (Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-12)	24
6.5	剖検所見 (Table 5-1~5-4、Appendix 5-1~5-96)	24
6.5.1	雌雄の生存動物 (投与期間終了時)	24
6.5.2	雌の未分娩動物	24
6.5.3	授乳期間中に全児が死亡した母動物	25
6.6	病理組織学検査 (Table 6-1~6-4、Appendix 5-1~5-96)	25
6.6.1	雌雄の生存動物 (投与期間終了時)	25
6.6.2	雌の未分娩動物	25
6.6.3	授乳期間中に全児が死亡した母動物	25
6.7	性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)	25
6.8	交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)	26
6.9	分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)	26
6.10	出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-4)	26
6.11	出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-4)	26
6.12	出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)	26
6.13	出生児の授乳4日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)	26
7.	考察	27
7.1	反復投与毒性	27
7.2	生殖発生毒性	27
8.	文献	28

図

Fig. 1、2	体重
Fig. 3、4	摂餌量

表

Table 1-1~1-4	一般状態
Table 2-1~2-4	体重
Table 3-1~3-4	摂餌量
Table 4-1、4-2	器官重量
Table 5-1~5-4	剖検所見
Table 6-1~6-4	病理組織学検査
Table 7	性周期
Table 8	交配成績
Table 9	分娩成績
Table 10	出生児の性比及び外表観察
Table 11	出生児の生存率
Table 12	出生児の体重
Table 13	出生児の生後4日剖検所見

3. 要約

N-エチルアニリン 0 (対照群：ゴマ油)、1、5 及び 25 mg/kg/day を、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄には交配前 14 日間に加え交配期間を通して剖検前日まで (42 日間)、雌には交配前 14 日間に加え交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日まで (41~53 日間) 強制経口投与し、反復投与毒性及び生殖発生毒性の概略について検討した。

3.1 反復投与毒性

一般状態、体重及び摂餌量には被験物質投与の影響は認められなかった。

病理学検査では、脾臓で大型化と重量の高値が 25 mg/kg 投与群の雌雄にみられ、褐色色素沈着の増加が 5 mg/kg 以上の投与群の雌雄に、髄外造血の亢進が 5 mg/kg 以上の投与群の雄に、さらにうっ血が 25 mg/kg 投与群の雌雄に観察された。また、肝臓でクッパー細胞の色素沈着が 25 mg/kg 投与群の雌雄、髄外造血の亢進が 25 mg/kg 投与群の雌に観察され、腎臓で重量の高値が 25 mg/kg 投与群の雌に認められた。

3.2 生殖発生毒性

性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率、受胎率、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率に被験物質投与の影響は認められず、授乳期間中の哺育状態にも異常が認められないことから、25 mg/kg 投与群においても雌雄動物の交尾能、授精能及び受胎能、母動物の妊娠維持、分娩及び哺育行動などの生殖機能への影響はないと判断した。

出生児では、出生時の外表観察、出生時及び生後 4 日の雌雄体重並びに性比、生後 4 日の生存率及び剖検所見に被験物質投与による影響は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下で *N*-エチルアニリンを反復経口投与することにより、雌雄の 5 mg/kg 以上の脾臓に被験物質投与に起因する変化が惹起された。したがって、本被験物質の雌雄動物における反復投与毒性に対する無影響量及び無毒性量は雌雄で 1 mg/kg と判断した。また、雌雄親動物と児動物における生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量はいずれも 25 mg/kg 以上と判断した。

R-1061

4. 緒言

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室の委託により、*N*-エチルアニリンのラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験を実施したので、その成績を報告する。

R-1061

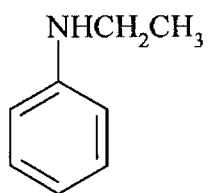
5. 試験材料及び方法

5.1 被験物質及び媒体

5.1.1 被験物質

N-エチルアニリンは 以下の情報とともに購入した。また、試験開始前に赤外吸収スペクトルの測定により特性が確認されている（試験番号：A-2272、添付資料 1）。

名称 : *N*-エチルアニリン
英語名称 : *N*-Ethylaniline
CAS 番号 : 103-69-5
官報公示整理番号 : 3-118、3-206
構造式又は示性式 :



分子式 : $C_8H_{11}N$
分子量 : 121.18
常温における性状 : 黄色透明液体
臭い : 刺激臭
融点 : $-63.5^{\circ}C$
沸点 : $204^{\circ}C$
蒸気圧 : 133Pa/ $38.5^{\circ}C$
蒸気密度 : 4.2
溶解性 : 易溶；アセトン、ベンゼン
不溶；水
引火点 : $91^{\circ}C$
発火点 : $479^{\circ}C$
純度（GC） : 99.5%
不純物 : 不明
比重（20/20） : 0.9623
屈折率 $n_{20/D}$: 1.5544
入手量 : 1000 mL（500 mL；2本）
保存方法 : 遮光、冷暗所（冷蔵庫内、許容値：1~ $10^{\circ}C$ 、実測値：3~ $6^{\circ}C$ ）に保存した。

保存場所	:	御殿場研究所被験物質保存室及び第2研究棟4階被験物質調製室
取扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防止した。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをした。
安定性	:	株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で投与期間終了後に残余被験物質の赤外吸収スペクトルを確認した結果、実験実施前に確認した参照スペクトルとほぼ同様であり安定性（保存期間の温度実測値：3~8℃）に問題はなかった（添付資料2）。
残量の処理	:	被験物質 5 g を保存試料として御殿場研究所被験物質保存室に保存した。動物試験及び分析終了後の残量は全て焼却処分した。

5.1.2 媒体

名称	:	ゴマ油
製造者	:	丸石製薬株式会社
規格	:	日本薬局方
ロット番号	:	0607
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所第2研究棟4階被験物質調製室

なお、媒体については、*N*-エチルアニリンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験に使用されている。また、本試験に先立って実施した「HPLCを用いた*N*-エチルアニリンの被験液中濃度測定法バリデーション及び安定性試験（媒体：ゴマ油）」（株式会社ボゾリサーチセンター試験番号：A-2272）において、ゴマ油中での被験物質の安定性に良好な結果が得られていることから、ゴマ油を選択した。

5.2 投与液の調製及び保存方法

5.2.1 対照群投与液の採取

被験液調製当日の被験物質を取り扱う前に、対照群投与液として必要量の媒体を褐色ガラス瓶に貼付したラベルを確認しながら分注し、投与に使用するまで被験液と同様に保存した。

5.2.2 被験液の調製及び保存

濃度ごとに必要量の被験物質を秤取し、媒体を加え溶解させた後、規定量にメスアップして、0.33、1.7及び8.3 mg/mL液（低、中及び高用量群投与液）をそれぞれ調製

した。調製は最大 7 日分を一括して行い、調製した被験液は褐色ガラス瓶に入れて冷所（冷蔵庫内、許容値：1~10℃、実測値：3~9℃）に保存し、安定性の確認された範囲内で投与に使用した。残液はポリ瓶に回収又はペーパータオル等に吸着させて焼却処分した。

5.2.3 被験液の安定性

本被験物質の 0.3 及び 100 mg/mL 溶液（媒体：ゴマ油）は、褐色ガラス瓶に入れ冷所（冷蔵庫内、許容値：1~10℃）で 7 日間、その後室温で 24 時間安定であることを株式会社ボゾリサーチセンターで確認されている（株式会社ボゾリサーチセンター試験番号：A-2272、添付資料 3）。

5.2.4 被験液の濃度確認

雄の投与 1 週と投与 6 週の 2 回、投与に用いる各濃度の被験液について、投与に使用する前に株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所で HPLC 法により濃度確認を実施した。その結果、各濃度液における表示値に対する被験物質の割合は 98.8~108.2% であり、いずれも許容範囲内（濃度：表示値に対する割合；100.0±10.0%）であった（添付資料 4、5）。分析法の概略を以下に示す。

[測定対象標準物質]

被験物質の一部を標準物質として使用した。

名称	:	N-エチルアニリン
ロット番号	:	VCNBD
純度	:	99.5%
保存方法	:	遮光、冷暗所〔冷蔵庫内（許容値：1~10℃、実測値：2~8℃）に保存した。〕
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び生化学部標準物質保存場所

[試薬]

試薬名	等級	メーカー
エタノール	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
メタノール	HPLC 用	Thermo Fisher Scientific, Inc.
精製水	Milli-Q 水製造システム	

[使用機器]

1) HPLC システム

機器名及び型式		メーカー
HPLC	2695 セパレーションモジュール	Waters Corporation
検出器	2487 デュアルλ UV/VIS 検出器	
データ処理装置	ミレニアム ³² クロマトグラフィーマネジャー	

2) 天秤

機器名及び型式	メーカー
分析用上皿電子天秤 AE240	Mettler-Toledo AG

3) その他の機器

機器名及び型式	メーカー
Milli-Q 水製造システム Milli-Q Advantage A10	Millipore Corporation
ソニケータ T460	Elma Hans Schmidbauer GmbH & CoKG

[試液の調製]

HPLC 移動相 [精製水／メタノール (35:65、v/v)]

試薬 : 精製水
メタノール

調製方法 : 精製水 350 mL とメタノール 650 mL を混合した。

使用期限 : 調製後 30 日以内 (本試液は調製日翌日まで使用した。)

[標準原液の調製]

以下に示すように、標準原液を用時調製した。

調製試料	採取試料	採取量 (g)	定容量 (mL)	調製濃度 (μg/mL)
標準原液	N-エチルアニリン	0.0202 又は 0.0201	100	202 又は 201

溶媒：エタノール

[標準溶液の調製]

以下に示すように、標準溶液を用時調製した。

調製試料	採取試料	採取量 (mL)	定容量 (mL)	調製濃度 (μg/mL)
希釈標準原液	標準原液	2.5	50	10.1
標準溶液	希釈標準原液	2	20	1.01

溶媒：エタノール

[測定実測試料の調製]

0.33、1.7 及び 8.3 mg/mL 被験液をそれぞれ n=1 で採取し、以下の表に示すように測定実測試料を用時調製した。なお、1 次希釈では、定容する前に超音波処理し溶解後、定容とした。

被験液 (mg/mL)	1 次希釈		2 次希釈		3 次希釈		希釈率
	採取量 (mL)	定容量 (mL)	採取量 (mL)	定容量 (mL)	採取量 (mL)	定容量 (mL)	
0.33	1	100	1.5	5			1000/3
1.7	1	100	2	30			1500
8.3	1	100	2	30	2	10	7500

溶媒：エタノール

[HPLC 測定条件]

カラム : Mightysil RP-18 GP 150 × 4.6 mm、5 μm (関東化学株式会社)

カラム恒温槽設定温度

: 40°C

HPLC 移動相 : 精製水／メタノール (35:65、v/v)

流量 : 1.0 mL/min

検出 : UV (測定波長 254 nm)

オートサンプラー設定温度

: 10°C

注入量 : 10 μL

測定時間 : 11 min

注入順序 :

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液 (システム適合性)
2	3	標準溶液 (定量用)
3	1	測定実測試料 (0.33 mg/mL)
4	1	測定実測試料 (1.7 mg/mL)
5	1	測定実測試料 (8.3 mg/mL)

標準溶液及び測定実測試料の測定は、測定開始後 24 時間以内に実施した。なお、バリデーション試験で、オートサンプラー内 24 時間の保存安定性が確認されている。

[測定システム適合性]

測定開始時に標準溶液を HPLC へ 3 回連続注入して N-エチルアニリンの保持時間及びピーク面積の再現性を確認した。

評価基準 : 保持時間及びピーク面積の相対標準偏差が 5% 以下。

その結果、N-エチルアニリンの保持時間の相対標準偏差は 0.0%、ピーク面積の相対標準偏差は 0.6% 以下と、いずれも基準の 5% 以下を満たしていた。このことから本測定はシステムの妥当性が保証された中で実施された。

[被験液中 N-エチルアニリン濃度の算出]

標準溶液を HPLC へ 3 回注入して N-エチルアニリンのピーク面積の平均値 (Qs) を求めた。次に測定実測試料を HPLC へ 1 回注入して N-エチルアニリンのピーク面積 (Qt) を求め、以下の式により被験液中の N-エチルアニリン濃度を算出した。また、表示値に対する割合 (%) を算出した。

$$\text{被験液中 N-エチルアニリン濃度 (mg/mL)} = \frac{Q_t}{Q_s} \times A \times F \times \frac{1}{1000}$$

Qt : 測定実測試料中の *N*-エチルアニリンのピーク面積

Qs : 標準溶液の *N*-エチルアニリンの平均ピーク面積

A : 標準溶液中の *N*-エチルアニリン濃度 (μg/mL)

F : 希釈率

5.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりげっ歯類を用いた試験が必要とされていることからラットを選択した。また、この試験に使用された系統のラットは一般毒性試験、生殖発生毒性試験に広く用いられ、かつ、その特性がよく知られており、背景資料が豊富であることから選択した。

5.4 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] の雌雄 62 匹をそれぞれ 8 週齢で入手^{注)}し、入荷日を馴化 1 日と起算して、3 日間の検疫期間を含む 20 日間の馴化飼育を行った。その間、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (馴化 1、3、10、17 及び 20 日の 5 回) 及び膣垢検査 (馴化 4 から 17 日の 14 日間) を実施した。その結果、一般状態及び性周期に異常がなく、体重増加が良好な雌雄 48 匹を選択し、10 週齢で投与に使用した。なお、性周期については、膣垢像を発情前期、発情期、発情後期及び発情休止期に分類し、それらの周期が 4~5 日ごとに繰り返されない場合を性周期異常とした。動物は検疫・馴化期間中の体重増加量 (検疫初回の体重~群分け時の体重) により選別後、群分け当日 (投与開始の前日) 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各群に割付けた。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組み合わせ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた) で行った。投与開始時の体重範囲は雄で 368~434 g (平均体重: 394 g)、雌で 234~280 g (平均体重: 254 g) であった。群分けから除外された動物のうち、雄 14 匹は投与開始後に試験から除外し、有効利用を目的として動物管理責任者に移管した。残りの雌 14 匹は無処置動物として継続飼育したが、交配に用いなかったため、交配終了後に試験から除外し、有効利用を目的として動物管理責任者に移管した。

注) : 試験計画書に従い、動物発注数は雌雄各 60 匹であったが、実際には雌雄各 62 匹が納入された。

5.5 飼育条件

動物は、温度 23±3℃ (実測値: 21~29℃、26℃ からの逸脱は 9 回みられたが、いずれも 30 以内に復帰した。最高値は 29℃)、相対湿度 50±20% (実測値: 40~70%)、換気回数 10~15 回/時間、照明 12 時間/日 (07:00~19:00) の動物飼育室 (飼育室番号: 808 号室) でブラケット式金属製網ケージ (W254×D350×H170 mm: リードエンジニ

アリング株式会社)に個別に、交配中は雌雄各1匹の計2匹を収容した。なお、妊娠17日から授乳4日までは、床敷(ホワイトフレーク：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(W340×D400×H185 mm：日本クレア株式会社)に1腹単位で収容した。飼料はNMF固形(放射線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：100518、100611、100713)をステンレス製給餌器により自由に摂取させた。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。ただし、プラスチック製エコンケージに収容している間は給水瓶を使用した。飼料及び床敷中の混入物質等に関しては、供試飼料はEurofins Scientific Analyticeで実施した分析結果をそれぞれ入手し、床敷については、Eurofins Scientific Analyticeで定期的(年6回)に実施した分析結果を入手した。飲料水については、水道法に準拠した水質の分析を芝浦セムテック株式会社(旧社名：東芝機械環境センター株式会社)に定期的(年4回)に依頼し、結果を入手した。これらのデータは試験成績に影響を与える可能性のないことを確認し、分析報告書の写しを保存した。

5.6 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に小動物用耳標をつけて行った。群分け後は、性別及び投与量ごと(対照群、低、中及び高用量の順)に4桁の番号をつけた。なお、1000の位は群、100の位は性(0番を雄、1番を雌)、10と1の位は個体番号とした。飼育ケージに投与量(群)ごとに色分けしたケージラベルを付け、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、剖検予定日(雄)、交尾成立日(雌雄)及び分娩日(雌)を明記した。

5.7 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421に準じ、経口投与を選択した。投与期間は雄で42日間(交配前14日間、交配期間を通して剖検前日まで)、交配群の雌で41~53日間(交配前14日間、交配期間及び妊娠期間を通して授乳4日まで)とした。ただし、不妊であった動物(動物番号：1105及び4107)については40又は43日とした。また、全児死亡母動物(動物番号：2110)については39日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1回/日(7回/週)とした。

5.8 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与に際して一般的な強制経口投与とした。投与容量は3 mL/kg体重とし、フレキシブル胃ゾンデを用いて投与液を1日1回、08:31~12:18の間に強制経口投与した。ただし、投与時に分娩中であった動物は分娩終了を待って、14:41~15:56の間に投与した。対照群には媒体(ゴマ油)のみを同様に投与した。個体ごとの投与液量(表示単位：0.1 mL、小数第二位を四捨五入)は、最近時の体重を基準に算出した。

5.9 投与量及び群構成

投与量 1、5 及び 25 mg/kg の 3 用量とし、媒体を投与する対照群を加え 4 群構成とした。1 群当たりの動物数は各群で雌雄各 12 匹とした。群構成を表 11-1. に示した。

表 11-1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	被験液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対 照 群	0	0	3	雄	12	1001~1012
				雌	12	1101~1112
低用量群	1	0.33	3	雄	12	2001~2012
				雌	12	2101~2112
中用量群	5	1.7	3	雄	12	3001~3012
				雌	12	3101~3112
高用量群	25	8.3	3	雄	12	4001~4012
				雌	12	4101~4112

5.10 投与量の設定根拠

投与量は、先に実施した「N-エチルアニリンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験、財団法人 畜産生物科学安全研究所、投与量：1、5、25、及び 125 mg/kg」の結果を参考に設定した¹⁾。一般状態、体重及び摂餌量では 125 mg/kg 投与群の雌雄でチアノーゼ、眼球及び尿の褐色化、皮膚蒼白などの症状がみられ、体重増加の抑制及び摂餌量の減少が雄に認められた。血液学及び血液化学検査では 5 mg/kg 以上の投与群でいずれも有意なメトヘモグロビン含有率の増加、ハインツ小体保有赤血球の出現を伴う溶血性貧血の所見並びにプロトビン時間の短縮、25 mg/kg 以上の投与群でカリウムの増加、125 mg/kg 投与群の雄あるいは雌雄で総ビリルビン及びアルブミンの増加、血小板及びナトリウムの減少が認められた。病理学検査では 5 mg/kg 投与群の雌及び 25 mg/kg 以上の投与群の雌雄で脾臓重量の増加が認められ、組織学的にはヘモジデリン沈着及び赤芽球系髄外造血巣の増加、うっ血、濾胞縁帯リンパ球の減少が認められた。また、ヘモジデリン沈着は肝臓及び腎臓にも認められ、赤芽球系造血亢進所見が骨髓及び肝臓に認められた。以上のように N-エチルアニリンのラットへの投与によりメトヘモグロビン血症及びそれに伴う溶血性貧血が発現した。無影響量は雌雄ともに 1 mg/kg/day と推定された。したがって、簡易生殖毒性試験における投与量は明らかな被験物質投与の影響が予想される 25 mg/kg を高用量とし、以下公比 5 で除して 5 及び 1 mg/kg をそれぞれ中及び低用量に設定する。

5.11 観察及び検査の方法

試験日の起算は、投与開始日を投与 1 日、投与 1 日から 7 日を投与 1 週、交尾成立日を妊娠 0 日、分娩終了日を授乳 0 日、出産日（出生日）を哺育 0 日（生後 0 日）とし、以下に示す項目について、それぞれ記載の時期に観察及び検査を実施した。

5.11.1 一般状態の観察

全個体について、馴化期間中は毎日1回、投与期間中は毎日3回（投与前、投与直後及び投与約2時間後）、それぞれ体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態における異常の有無を観察した。なお、妊娠期間中の動物を手にとっての定期的な観察は、妊娠0、7、14及び20日に行った。

5.11.2 体重測定

馴化期間中は全個体について、馴化1、3、10、17及び20日に体重を測定した。雄は投与1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、42日及び剖検日に、雌は投与1、4、8、11、15日（未交尾動物は交配期間中の投与18、22及び25日）、妊娠0、4、7、11、14、17及び20日、授乳0及び4日並びに剖検日に体重を測定した。なお、午後の分娩観察時に分娩の終了が確認された個体の授乳0日の体重測定(13:58~16:49)を除き、08:36~11:18の間に体重測定を行った。剖検日の体重は前日から約16時間絶食させた後、相対器官重量算出に備えて07:55~08:42の間に測定した。

5.11.3 摂餌量測定

全個体について、雄は投与1、4、8、11、15、32、36、39及び42日に、雌は投与1、4、8、11及び15日、妊娠1、4、7、11、14、17及び20日並びに授乳2及び4日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差から1匹当たりの1日摂餌量を算出した。給餌量及び残餌量の測定は08:22~11:34の間に行った。

5.11.4 膣垢検査

馴化期間中は全個体について、膣垢を採取し鏡検した。投与期間中は全個体について、投与開始翌日から交尾が認められるまで毎日（午前中）膣垢を採取し、鏡検した。膣垢像は発情前期、発情期、発情後期及び発情休止期に分類し、馴化期間中は性周期異常の有無を、交配前投与期間中は発情期像発現回数及び発情期から次の発情期までの日数（性周期）を調べ、交配期間中は膣垢内の精子の有無を調べた。

5.11.5 交配方法

交配前投与期間終了後、同じ投与群の交配群の雌雄を1:1で終夜同居させ、翌朝、膣栓形成あるいは膣垢中に精子を確認したものを交尾成立とみなした。交配開始日を0日と起算して交尾までに要した日数を調べた。同一雌雄による同居期間は最長13日間であった。

5.11.6 分娩及び哺育観察

1) 母動物の観察

交尾の確認された雌動物は全例自然分娩させ、分娩状態の異常の有無を観察した。分娩終了の確認（授乳0日の測定及び観察）は、妊娠21日から25日までの午前と午

後の1日2回（妊娠25日は午前10時までに1回）行った。妊娠期間は0.5日単位で表示し、1日単位で算出した。分娩が17時までに終了していた場合、その日を授乳0日とした。分娩が終了した母動物は胎盤及び羊膜の処理の有無を観察後、授乳4日まで出生児を哺育させ、児集め、営巣及び授乳を指標として哺育状態を観察した。分娩した母動物は授乳5日に病理学検査に供した。なお、妊娠25日の午前10時までに分娩が終了しなかった対照群1例（動物番号1105）、5 mg/kg 投与群の1例（動物番号3110）及び25 mg/kg 投与群の1例（動物番号4107）は、エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査に供した。妊娠の有無を確認した。その結果、5 mg/kg 投与群の1例（動物番号3110）は子宮内に大きい胎児を1匹確認されたが、他の動物は着床が認められなかったため不妊とし、妊娠期間中のデータを統計解析より除外した。

2) 出生児の観察

出生日（生後0日）に出生児数及び死産児数を数えた。出生児は外表異常の有無を観察^{注)}し、性別を判定して体重を測定した後、母動物に哺育させた。外表異常児はエーテル深麻酔により安楽死させた後、リン酸緩衝10 vol%ホルマリン液に固定し、保存した。出生児の生死の観察を生後4日まで毎日1回行った。なお、死産児及び死亡児は廃棄した。

生後4日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ剖検を行い、体外表、胸部、腹部を含む器官・組織の異常の有無を調べた。なお、出生児の体重は個体別に測定し、各腹単位で雌雄別に平均値を算出した。

注)：頭部の陥没や裂、顔面の鼻吻や上下顎、口唇のゆがみや裂、眼瞼や耳介の大きさ、形状、左右のバランス、胸膈部のゆがみや大きさ、内部臓器の突出、尾部の長さ、形状、数、欠損、四肢部の長さ、形状、指の数、欠損及び左右のバランスに注意して観察し、正常と異なる場合を異常とした。

5.11.7 病理学検査

1) 剖検及び器官重量測定

最終投与翌日に全ての生存動物について、エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、それぞれ体外表、頭部、胸部、腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。なお、母動物については剖検時に黄体数及び着床痕数を数えた。次いで、肝臓、腎臓、脾臓、精巣及び精巣上体の重量を測定した。器官重量（絶対重量）と剖検時の体重から体重100 g当たりの相対重量を算出した。なお、精巣、精巣上体及び腎臓については左右別々に測定し、その合計値で評価した。妊娠25日未分娩動物及び授乳期間中に全哺育児が死亡した母動物については放血致死させた後、剖検した。なお、これら母動物から得られたデータについては、統計解析に含めなかった。

2) 病理組織学検査

全ての個体について、以下に示す全検査対象器官/組織をリン酸緩衝10 vol%ホルマリン液で固定し、保存した。異常部位の肺には固定時にリン酸緩衝10 vol%ホルマリ

ン液を注入した。精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、リン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液に置換し保存した。次いで、パラフィン包埋した後、切片とし（個体識別部（耳標を装着した耳介）は固定・保存のみとした）、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色を行った。鏡検は、対照群及び高用量群並びに妊娠 25 日未分娩及び授乳期間中に全哺育児が死亡した母動物の全個体の全検査対象器官/組織並びに全動物の肉眼的異常部位について行った。両側性の器官については両側を摘出し、腎臓、精巣、卵巣、精巣上体及び精嚢は両側、子宮は両角部を鏡検した。その結果、高用量群で被験物質投与による変化が疑われた肝臓及び脾臓について、中及び低用量群を含め全例について鏡検した。なお、精巣については H・E 染色標本で被験物質投与の影響が認められなかったため、PAS 染色標本による観察は行わなかった。また、腎臓所見で「好酸性小体」は観察されなかったため $\alpha 2u$ -グロブリンの免疫組織化学的染色による観察は行わなかった。

肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮、膣、肉眼的異常部位、個体識別部（耳標を装着した耳介）

5.12 統計解析

5.12.1 パラメータの算出

以下の式により交尾率、授精率、受胎率及び出産率は群ごとに、妊娠期間、着床率、死産児率、外表異常率、出生率、生後 4 日生存率、生後 0 及び 4 日の出生児の性比は母動物ごとに算出した。なお、出生児の体重は母動物ごと雌雄別に平均値を求めた。

交尾率(%) = (交尾動物数/同居動物数) × 100

授精率(%) = (雌を妊娠させた雄の数/交尾した雄の数) × 100

受胎率(%) = (妊娠した雌の数/交尾した雌の数) × 100

妊娠期間(日) = 妊娠 0 日から分娩した日までの日数

出産率(%) = (出生児出産雌数/妊娠雌数) × 100

着床率(%) = (着床痕数/黄体数) × 100

死産児率(%) = (死産児数/出生児数及び死産児数) × 100

外表異常率(%) = (外表異常児数/出生児数) × 100

出生率(%) = (出生児数/着床痕数) × 100

生後 4 日生存率(%) = (生後 4 日の生存児数/出生児数) × 100

生後 0 日の性比 = 雄出生児数/出生児数

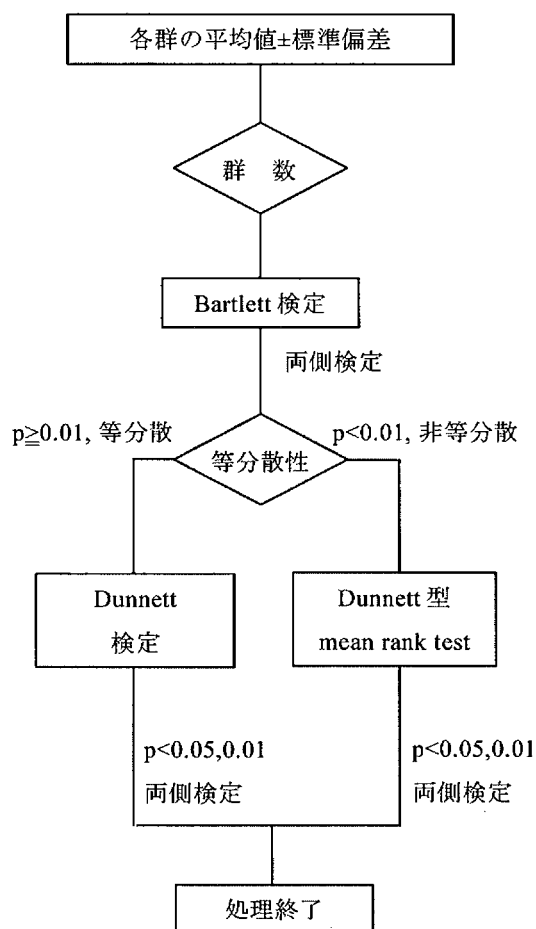
生後 4 日の性比 = 生後 4 日の雄生存児数/生後 4 日の生存児数

5.12.2 検定

データは対照群と各用量群との差について統計学的有意性の検定を行った。

体重、体重増加量（雄：投与 1~42 日、雌：投与 1~15 日、妊娠 0~20 日及び授乳 0~4 日、出生児：生後 0~4 日）、摂餌量、発情期像発現回数、性周期（発情周期）、交尾

までに要した日数、妊娠期間、黄体数、着床痕数、生存児数、性比（生後 0 及び 4 日）及び器官重量（含、剖検時体重）は、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、次に示す模式図の方法に従って検定した^{2), 3), 4)}。



着床率、死産児率、外表異常率、出生率及び生後 4 日生存率については、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、Dunnett 型 mean rank test により平均順位の差の検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った⁴⁾。

交尾率、授精率、受胎率、出産率は、各群の交尾動物数、雌を妊娠させた雄動物数、妊娠雌動物数、生存児出産雌動物数より算出し、Yeates の連続修正による χ^2 検定を行った（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）。ただし、期待度数が 5 以下のセルがみられる場合には Fisher の直接確率計算法により検定を行った（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）⁴⁾。

6. 試験結果

6.1 一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)

雄では、いずれの動物にも投与期間を通じて異常はみられなかった。

雌では、鼠径部の皮下結節が 25 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号 4111) で授乳期間中にみられたが、1 例のみの発現であることから、偶発性変化と判断した。

6.2 体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)

雄では、対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

雌では、5 及び 25 mg/kg 投与群で対照群との間に有意差は認められなかった。その他、1 mg/kg 投与群で交配前投与期間中の体重増加量に有意な低値が認められたが、用量との関連がないことから、偶発的変化と判断した。

6.3 摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)

雌雄ともに、被験物質投与によると考えられる影響は認められなかった。

なお、有意な高値が 5 mg/kg 投与群の雄で投与 32 日、雌で投与 4 日、25 mg/kg 投与群の雄で投与 39 日、雌で妊娠 11 日に認められたが、軽度な一過性の高値であり、偶発性と判断した。

6.4 器官重量 (Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-12)

雄では、25 mg/kg 投与群で脾臓の絶対及び相対重量に有意な高値が認められた。

5 mg/kg 以下の投与群では対照群との間に有意差は認められなかった。

授乳 4 日の母動物では、25 mg/kg 投与群で脾臓及び腎臓の絶対及び相対重量に有意な高値が認められた。5 mg/kg 以下の投与群では対照群との間に有意差は認められなかった。

6.5 剖検所見 (Table 5-1~5-4、Appendix 5-1~5-96)

6.5.1 雌雄の生存動物 (投与期間終了時)

25 mg/kg 投与群では脾臓の大型化が雌雄各 10 例にみられた。

5 mg/kg 以下の投与群では、異常はみられなかった。

6.5.2 雌の未分娩動物

未分娩動物は対照群、5 及び 25 mg/kg 投与群で各 1 例みられた。

対照群の 1 例 (動物番号 1105) は不妊であったが、いずれの器官・組織にも異常はなかった。なお、交配相手の雄 (動物番号 1005) に右精巣上体尾部に結節がみられた。

5 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号 3110) は子宮内に大きい胎児を 1 匹確認されたが、いずれの器官・組織にも異常はなかった。

25 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号 4107) は不妊であり、脾臓の大型化がみられた。

なお、交配相手の雄（動物番号 4007）にも脾臓の大型化がみられた。

6.5.3 授乳期間中に全児が死亡した母動物

1 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号 2110）はいずれの器官・組織にも異常はなかった。

その他、Table 及び Appendix に示す所見がみられたが、いずれもその発現状況から偶発性変化と判断した。

6.6 病理組織学検査（Table 6-1~6-4、Appendix 5-1~5-96）

被験物質投与の影響と考えられる変化が肝臓及び脾臓にみられた。

6.6.1 雌雄の生存動物（投与期間終了時）

- | | | |
|-----|---|---|
| 肝 臓 | : | 軽微なクッパー細胞の色素沈着が 25 mg/kg 投与群の雄 9 例と雌 4 例、軽微又は軽度な髓外造血が 25 mg/kg 投与群の雌 8 例にみられた。 |
| 脾 臓 | : | 軽微又は軽度な褐色色素沈着の増加が 5 mg/kg 投与群の雄で 7 例と雌 2 例及び 25 mg/kg 投与群の雄 12 例と雌 3 例、軽微又は軽度な髓外造血が対照群、1、5 及び 25 mg/kg 投与群の雄でそれぞれ 5、5、11 及び 12 例みられ、5 mg/kg 以上の投与群の雄で発現頻度が増加し、かつ所見の程度が上昇した。軽微又は軽度なうっ血が 25 mg/kg 投与群の雄 12 例と雌 11 例にみられた。 |

6.6.2 雌の未分娩動物

未分娩動物は対照群、5 及び 25 mg/kg 投与群で各 1 例（動物番号 1105：不妊、動物番号 3110：子宮内に大きい胎児を 1 匹確認、動物番号 4107：不妊）みられた。

対照群の 1 例は、いずれの器官・組織にも異常はなかった。5 mg/kg 投与群の 1 例で脾臓の軽度な褐色色素沈着の増加、25 mg/kg 投与群の 1 例で脾臓に軽度な髓外造血の亢進、褐色色素沈着の増加及びうっ血並びに肝臓に軽微なクッパー細胞の色素沈着の増加がみられた。

6.6.3 授乳期間中に全児が死亡した母動物

1 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号 2110）はいずれの器官・組織にも異常はなかった。

その他、Table 及び Appendix に示す所見がみられたが、いずれもその発現状況及び病理組織学的性状から偶発性変化と判断した。

6.7 性周期（Table 7、Appendix 6-1~6-4）

対照群及び被験物質投与群では、性周期異常の動物はみられなかった。従って、発情期像発現回数及び平均性周期日数には対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

6.8 交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)

ほとんどの組合せが交配開始後 5 日までに交尾（ただし、対照群の 1 組が交配開始後 13 日、5 mg/kg 投与群の 1 組が交配開始後 8 日に交尾）し、交尾率は 100%であった。

交尾は認められたが雌不妊動物が対照群で 1 例（動物番号 1105）及び 25 mg/kg 投与群で 1 例（動物番号 4107）みられたが、受胎率及び授精率には対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

6.9 分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)

ほとんどの妊娠動物は妊娠 21~22 日に正常に分娩し、妊娠期間及び出産率には対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。また、出産児の生死数に異常はなく、黄体数、着床痕数、生存出生児数、着床率、死産児率及び出生率には対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

なお、未分娩動物が 5 mg/kg 投与群で 1 例（動物番号 3110、黄体数及び着床数は各 1 個、子宮内に大きい胎児（約 8 cm）を 1 匹確認）みられた。また、全児死産の母動物が 1 mg/kg 投与群で 1 例（動物番号 2110）みられた。この母動物は妊娠 24 日の午前中に死産児数 18 匹を分娩した。剖検の結果、黄体数（21）及び着床数（19）であり、特異的異常がないことから、娩出に時間を要したことが全児死産の一因と考えられた。しかし、これら動物の発現状況に用量との関連がないことから、偶発的変化と判断した。

6.10 出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-4)

生後時及び 4 日の性比には対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。外表異常を有する出生児は対照群で無尾が 1 例みられた。

6.11 出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-4)

授乳期間中の死亡児は対照群、1、5 及び 25 mg/kg 投与群でそれぞれ 1、5、5 及び 2 例であり、生後 4 日生存率には対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

6.12 出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)

出生時及び生後 4 日の雌雄体重並びに生後 0~4 日の間の体重増加量には対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

6.13 出生児の授乳 4 日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)

いずれの投与群の出生児にも異常はみられなかった。

7. 考察

N-エチルアニリンの0（対照群：ゴマ油）、1、5及び25 mg/kgを、Sprague-Dawley系 SPF ラットの、雄には交配前14日間に加え交配期間を通して剖検前日まで（42日間）、雌には交配前14日間に加え交配期間及び妊娠期間を通して授乳4日まで（41～53日間）強制経口投与し、反復投与毒性及び生殖発生毒性を検討した。

7.1 反復投与毒性

一般状態、体重及び摂餌量には被験物質投与の影響は認められなかった。

病理学検査では、肉眼的に25 mg/kg投与群の雌雄で脾臓の大型化がみられ、重量的に25 mg/kg投与群の雌雄で脾臓重量の高値、組織学的に5 mg/kg以上の投与群の雌雄で脾臓における褐色色素沈着の増加、5 mg/kg投与群の雄で脾臓の髄外造血の亢進、25 mg/kg投与群の雌雄で脾臓のうっ血、肝臓のクッパー細胞の色素沈着、同群の雌で髄外造血が観察された。また、25 mg/kg投与群の雌で腎臓重量の高値が認められた。同様な変化は28日間反復経口投与毒性試験¹⁾においても認められており、*N*-エチルアニリンのラットへの投与によりメトヘモグロビン血症及びそれに伴う溶血性貧血により発現したものと考えられた。

7.2 生殖発生毒性

性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には被験物質投与の影響は認められなかった。更に、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率に被験物質投与の影響は認められず、授乳期間中の哺育状態にも異常が認められないことから、25 mg/kg投与群においても雌雄動物の交尾能、授精能及び受胎能、母動物の妊娠維持、分娩及び哺育行動などの生殖機能への影響はないと判断した。

出生児では、出生時の外表観察、出生時及び生後4日の雌雄体重並びに性比、生後4日の生存率及び剖検所見に被験物質投与による影響は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下で*N*-エチルアニリンを反復経口投与することにより、雌雄の5 mg/kg以上の脾臓に被験物質投与に起因する変化が惹起された。したがって、本被験物質の雌雄動物における反復投与毒性に対する無影響量及び無毒性量は雌雄で1 mg/kgと判断した。また、雌雄親動物と児動物における生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量はいずれも25 mg/kg以上と判断した。

8. 文献

- 1) N-エチルアニリンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, 化学物質毒性試験報告, vol.3 pp.217-240 (1995)
- 2) Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods, 8th ed. Ames: Iowa State University Press; 1989.
- 3) Dunnett CW. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J Am Stat Assoc 1955; 50: 1096-121.
- 4) 佐久間昭 (1981) : 薬効評価－計画と分析－II, pp.23-27, 387-389, 東京大学出版会, 東京.

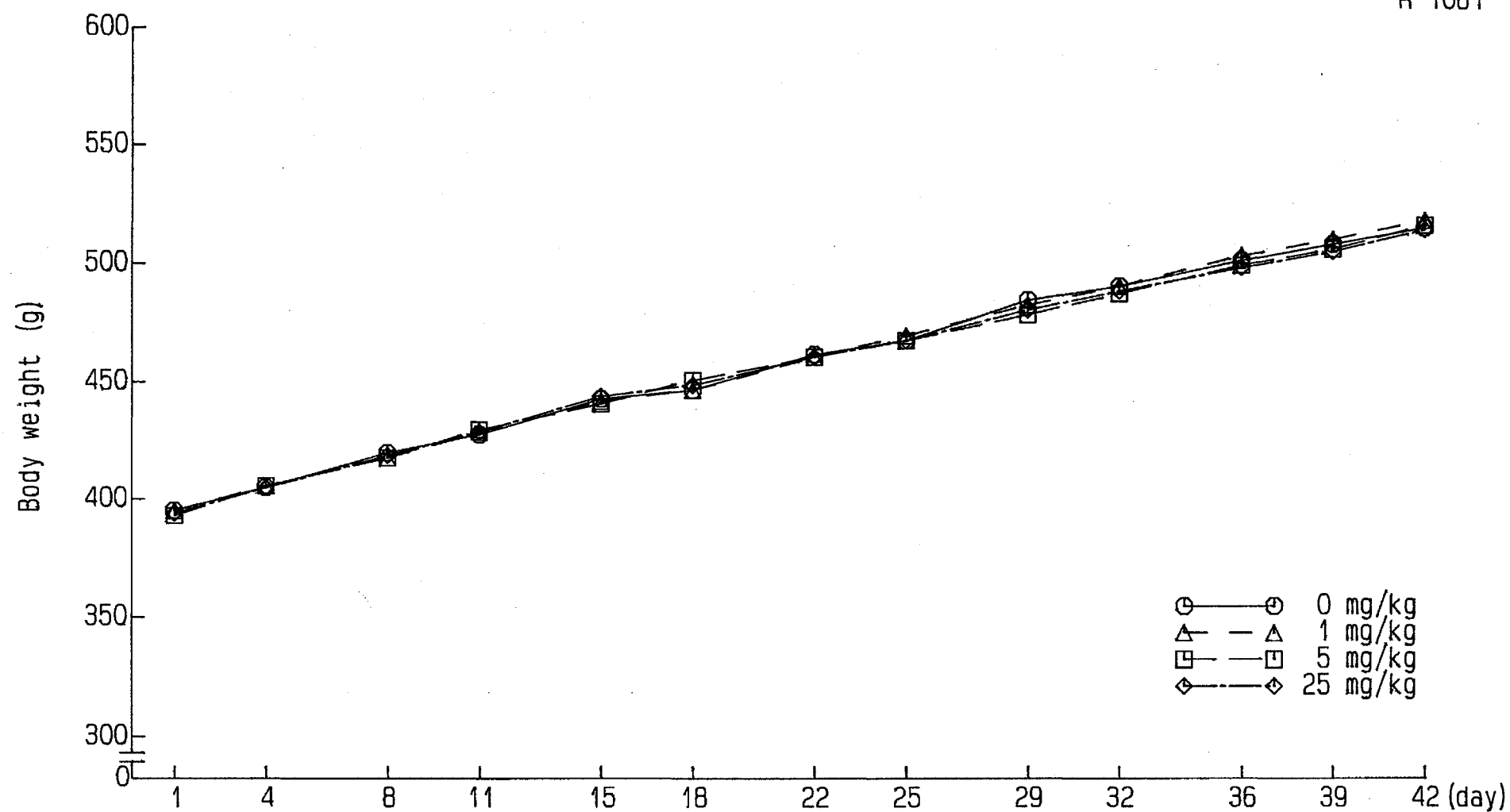


Fig.1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline

Body weight of male rats

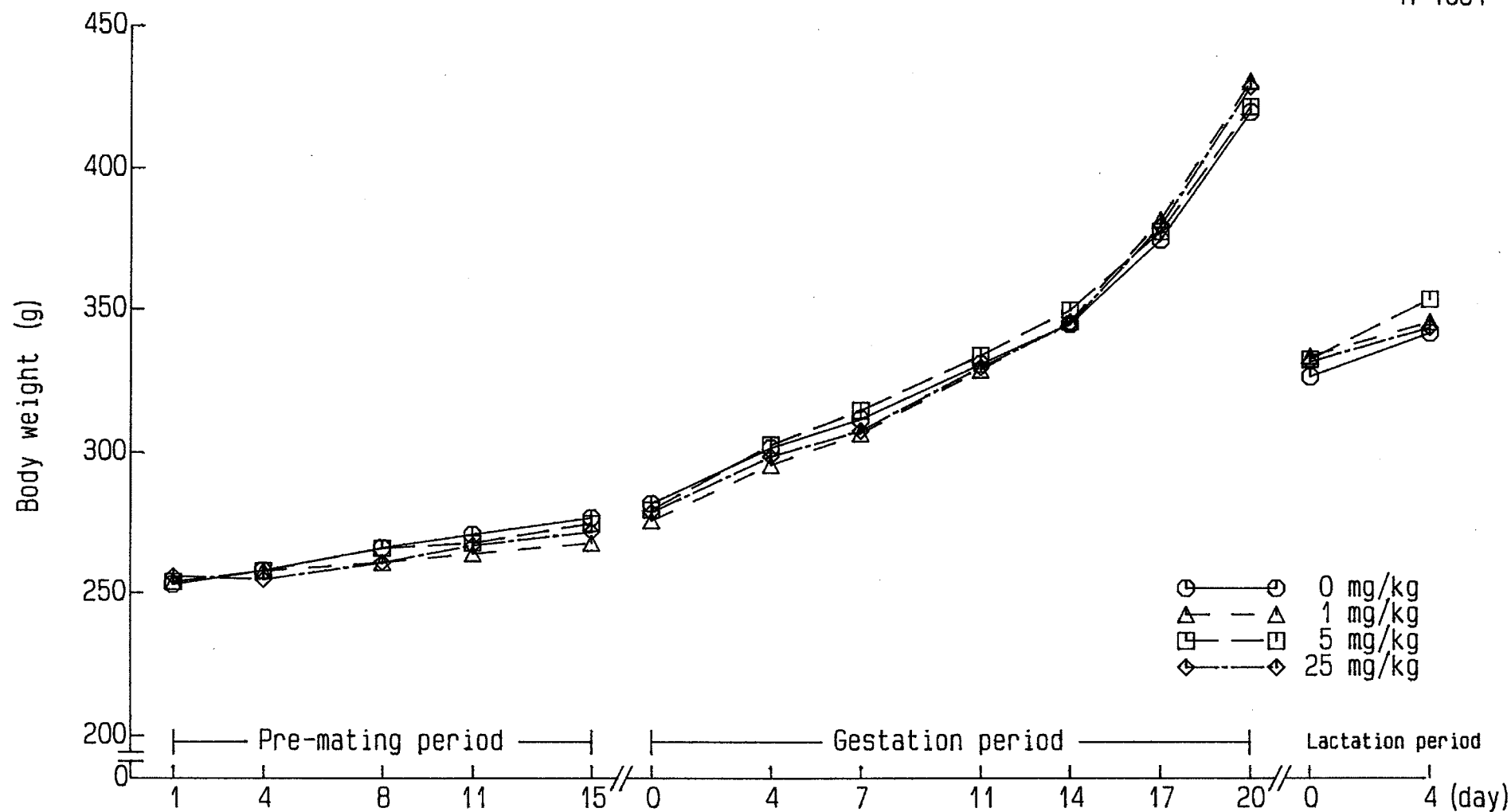


Fig.2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline

Body weight of female rats

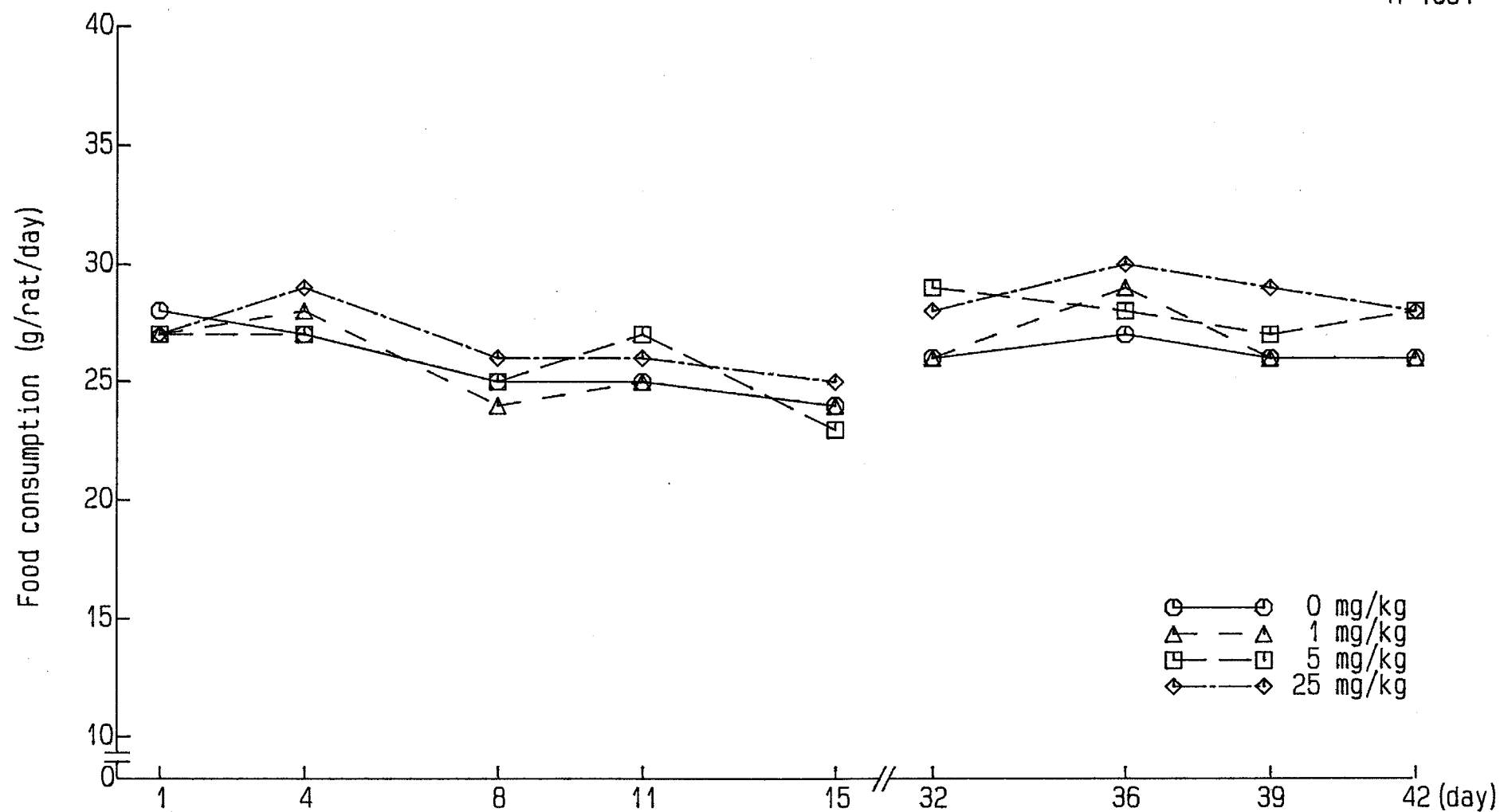


Fig.3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline

Food consumption of male rats

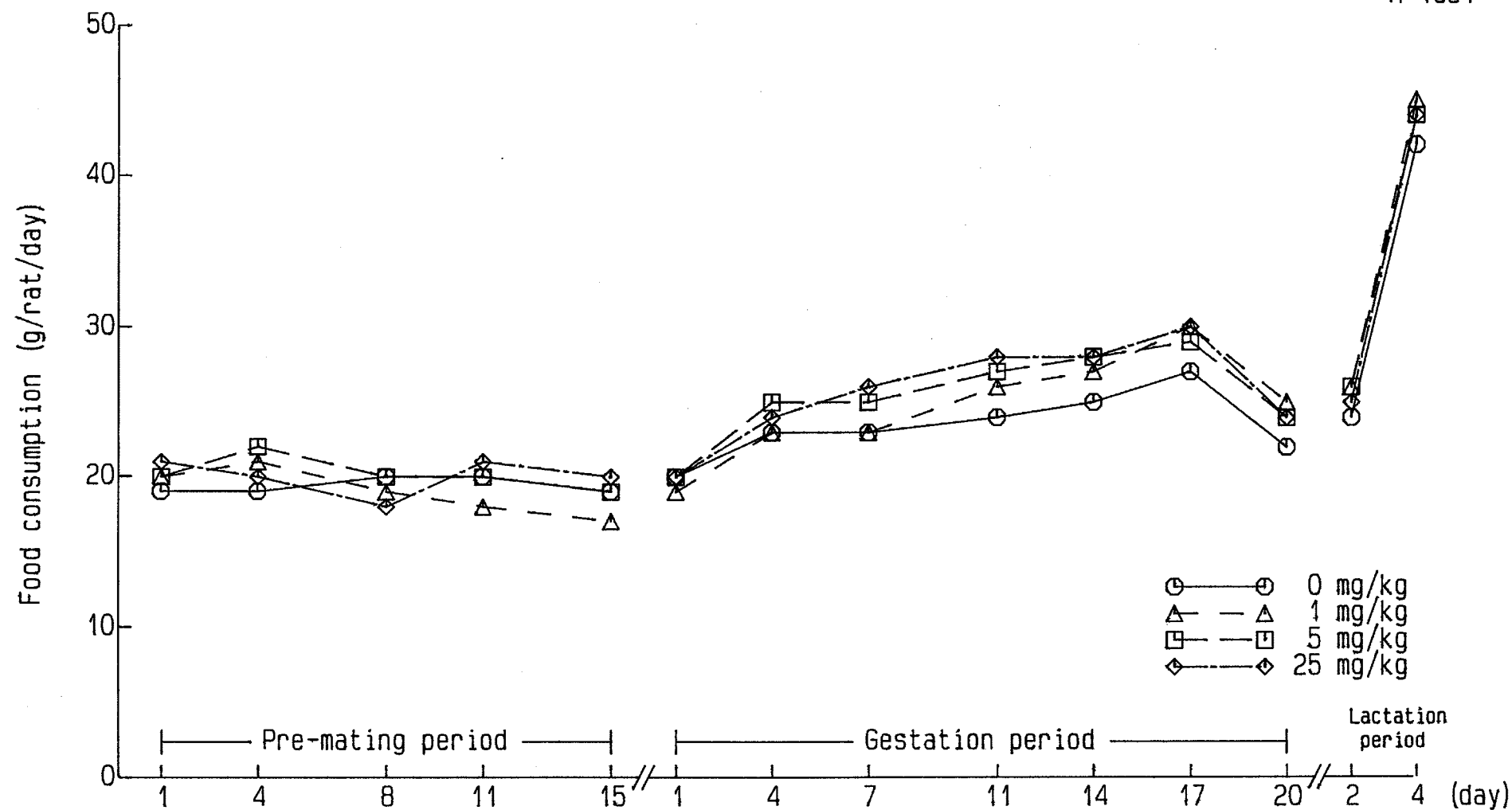


Fig.4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline

Food consumption of female rats

Table 1-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Clinical signs in male rats

Dose mg/kg	Signs	Day of administration						
		1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43a)
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
1	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
5	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
25	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0

a): Day of necropsy

Clinical signs in female rats during the pre-mating period

[illegible]

Table 1-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Clinical signs in dams during the gestation period

Dose mg/kg	Signs	Administration																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25a)
0	No. of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	1	0		
	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	0			
1	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	1	0	
	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	0	0		
5	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	1	1	1
	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	0	0	0	0
25	No. of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	1	0		
	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	0			

a): Gestation day

Table 1-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Clinical signs in dams during the lactation period

Dose mg/kg	Signs	Administration					5a)
		0	1	2	3	4	
0	No. of dams	11	11	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
1	No. of dams	12	11 ^{b)}	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
5	No. of dams	11	11	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
25	No. of dams	11	11	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	1	1	1	1	1	1
	Mass	1	1	1	1	1	1

a): Lactation day

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

Table 2-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline

Body weight of male rats

Dose mg/kg	Pre-mating period					Mating period				Post-mating period				Gain 1-42
	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	42a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	395	405	420	428	443	447	462	468	485	491	502	509	516
	S.D.	19	22	23	24	27	25	29	31	33	33	35	38	39
1	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	395	406	418	429	442	447	461	470	483	491	504	511	519
	S.D.	18	18	19	22	24	22	24	26	26	28	30	30	31
5	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	393	406	418	430	441	451	461	468	479	488	500	507	517
	S.D.	17	21	20	23	22	23	21	21	22	24	24	24	27
25	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	394	405	419	429	444	449	461	468	481	489	499	506	515
	S.D.	17	19	18	19	19	20	20	21	21	24	26	26	26

Unit: g

No.: No. of animals

a): Day of administration

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Body weight of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration					Gain 1-15
		1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	253	258	266	271	277	24
	S.D.	9	10	14	17	16	13
1	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	254	258	261	264	268	14*
	S.D.	12	15	17	16	19	9D
5	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	254	258	266	268	275	21
	S.D.	11	11	13	10	12	6
25	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	256	255	261	267	272	16
	S.D.	10	9	10	10	11	6

Unit: g

No.: No. of animals

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

D: Dunnett's test

Table 2-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Body weight of dams during the gestation period

Dose mg/kg	Administration								Gain 0-20
		0	4	7	11	14	17	20a)	
0	No.	11	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	282	302	312	331	345	375	420	138
	S.D.	16	12	13	13	16	19	22	18
1	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	276	296	307	329	346	382	431	154
	S.D.	18	19	20	20	22	22	24	15
5	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	280	303	315	334	350	378	422	142
	S.D.	14	14	16	17	16	22	29	25
25	No.	11	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	279	299	308	330	345	380	429	150
	S.D.	11	9	10	11	11	12	15	13

Unit: g

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Body weight of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration		Gain 0-4
		0	4a)	
0	No.	11	11	11
	Mean	327	342	15
	S.D.	25	17	27
1	No.	11 ^{b)}	11	11
	Mean	334	346	12
	S.D.	23	19	14
5	No.	11 ^{c)}	11	11
	Mean	333	354	21
	S.D.	30	23	20
25	No.	11	11	11
	Mean	332	344	12
	S.D.	20	21	9

Unit: g

No.: No. of dams

a): Lactation day

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

c): One dam was not delivered.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Food consumption of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Post-mating period			
		1	4	8	11	15	32	36	39	42a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	28	27	25	25	24	26	27	26	26
	S.D.	3	4	3	3	2	2	2	3	3
1	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	27	28	24	25	24	26	29	26	26
	S.D.	3	3	3	3	2	2	2	3	2
5	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	27	27	25	27	23	29*	28	27	28
	S.D.	3	2	3	2	2	3D	4	3	3
25	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	27	29	26	26	25	28	30	29**	28
	S.D.	2	3	3	3	2	3	3	2D	2

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

a): Day of administration

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

D: Dunnett's test

Table 3-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Food consumption of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration				
		1	4	8	11	15
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	19	19	20	20	19
	S.D.	2	3	3	4	3
1	No.	12	12	12	12	12
	Mean	20	21	19	18	17
	S.D.	2	2	3	3	4
5	No.	12	12	12	12	12
	Mean	20	22*	20	20	19
	S.D.	3	3D	4	2	2
25	No.	12	12	12	12	12
	Mean	21	20	18	21	20
	S.D.	2	3	2	3	3

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

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

D: Dunnett's test

Table 3-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Food consumption of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration						
		1	4	7	11	14	17	20a)
0	No.	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	20	23	23	24	25	27	22
	S.D.	2	2	3	2	3	3	2
1	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	19	23	23	26	27	30	25
	S.D.	3	3	3	3	3	4	2
5	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	20	25	25	27	28	29	24
	S.D.	3	3	4	3	5	4	3
25	No.	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	20	24	26	28*	28	30	24
	S.D.	1	3	3	3D	2	3	4

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Gestation day

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

D: Dunnett's test

Table 3-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Food consumption of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration	
		2	4a)
0	No.	11	11
	Mean	24	42
	S.D.	7	6
1	No.	11 ^{b)}	11
	Mean	26	45
	S.D.	7	4
5	No.	11 ^{c)}	11
	Mean	26	44
	S.D.	5	7
25	No.	11	11
	Mean	25	44
	S.D.	8	4

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Lactation day

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

c): One dam was not delivered.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 4-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Organ weight of male rats

		Dose mg/kg	Body weight g	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidneys (R+L) g(g/100g BW)	Testes (R+L) g(g/100g BW)	Epididymides (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	12	12	12	12	12	12
		Mean	518	17.81	0.78	3.29	3.28	1268
		S.D.	38	1.75	0.16	0.34	0.28	99
	1	No.	12	12	12	12	12	12
		Mean	524	17.23	0.77	3.22	3.19	1218
		S.D.	32	1.97	0.13	0.23	0.37	120
	5	No.	12	12	12	12	12	12
		Mean	520	17.66	0.85	3.32	3.42	1263
		S.D.	28	1.64	0.13	0.30	0.24	76
	25	No.	12	12	12	12	12	12
		Mean	518	17.73	1.46**	3.42	3.24	1270
		S.D.	28	1.52	0.22D	0.25	0.14	77
Relative	0	No.		12	12	12	12	12
		Mean		3.44	0.15	0.64	0.64	246
		S.D.		0.22	0.02	0.06	0.06	23
	1	No.		12	12	12	12	12
		Mean		3.28	0.15	0.62	0.61	233
		S.D.		0.24	0.02	0.05	0.07	24
	5	No.		12	12	12	12	12
		Mean		3.39	0.16	0.64	0.66	244
		S.D.		0.18	0.02	0.04	0.05	19
	25	No.		12	12	12	12	12
		Mean		3.42	0.28**	0.66	0.63	246
		S.D.		0.23	0.03D	0.04	0.04	15

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

D: Dunnett's test

Table 4-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline

Organ weight of female rats

		Dose mg/kg	Body weight g	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidneys (R+L) g(g/100g BW)
Absolute	0	No.	11	11	11	11
		Mean	348	15.29	0.77	2.09
		S.D.	13	2.03	0.14	0.16
	1	No.	11	11	11	11
		Mean	351	15.51	0.83	2.25
		S.D.	21	1.97	0.10	0.21
	5	No.	11	11	11	11
		Mean	358	15.27	0.83	2.27
		S.D.	17	1.92	0.14	0.18
	25	No.	11	11	11	11
		Mean	343	14.64	1.51**	2.31*
		S.D.	18	1.85	0.24D	0.23D
Relative	0	No.		11	11	11
		Mean		4.39	0.22	0.60
		S.D.		0.50	0.04	0.03
	1	No.		11	11	11
		Mean		4.42	0.24	0.64
		S.D.		0.53	0.03	0.04
	5	No.		11	11	11
		Mean		4.25	0.23	0.63
		S.D.		0.42	0.03	0.05
	25	No.		11	11	11
		Mean		4.28	0.44**	0.67**
		S.D.		0.50	0.07DT	0.07D

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

D: Dunnett's test

DT: Dunnett-type rank test

Table 5-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline
Gross pathological findings (End of administration period : D42)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 12	M 1 12	M 5 12	M 25 12
Findings					
Epididymis					
Nodule		1	0	0	0
Liver					
Hepatodiaphragmatic nodule		1	0	0	0
Spleen					
Large		0	0	0	10

M : Male

Table 5-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline
Gross pathological findings (End of administration period : L4)

Organs	Sex:	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 11	1 11	5 11	25 11
Liver					
Hepatodiaphragmatic nodule		0	0	1	0
Lung(bronchus)					
Focus, dark red		0	0	0	1
Skin					
Nodule		0	0	0	1
Spleen					
Large		0	0	0	10

F : Female

Table 5-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline
Gross pathological findings (Undelivered)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 1	F 5 1	F 25 1
Findings				
Spleen Large		0	0	1

F : Female

Table 5-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline
Gross pathological findings (All littermates died)

Organs	Sex:	F
Findings	Dose(mg/kg):	1
	Number:	1
All tissues		
Not remarkable		1

F : Female

Table 6-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline
 Histopathological findings (End of administration period : D42)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 12	M 1 12	M 5 12	M 25 12
Findings					
Epididymis					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		10	0	0	11
Cell infiltration, interstitial		1	0	0	1
minimal		1	0	0	1
Granuloma, spermatic		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Kidney					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		7	0	0	6
Regeneration, tubular		4	0	0	5
minimal		4	0	0	5
Urinary cast, hyaline		1	0	0	1
minimal		1	0	0	1
Cell infiltration, interstitial		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Liver					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		7	7	7	2
Hepatodiaphragmatic nodule		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Microgranuloma		4	5	5	5
minimal		4	5	5	5
Pigmentation, Kupffer cell		0	0	0	9
minimal		0	0	0	9
Cell infiltration, Glisson's sheath		0	0	0	1
minimal		0	0	0	1
Prostate					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		7	0	0	5
Cell infiltration, interstitial		5	0	0	7
minimal		4	0	0	7
mild		1	0	0	0
Seminal vesicle					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		12	0	0	12
Spleen					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		7	7	1	0
Brown pigment, increased		0	0	7	12
minimal		0	0	6	0
mild		0	0	1	12
Hematopoiesis, extramedullary		5	5	11	12
minimal		5	5	11	2
mild		0	0	0	10
Congestion		0	0	0	12
mild		0	0	0	12
Testis					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		12	0	0	12

M : Male

Table 6-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline
Histopathological findings (End of administration period : L4)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 11	F 1 11	F 5 11	F 25 11
Findings					
Kidney					
Number examined		11	0	0	11
Not remarkable		7	0	0	9
Dilatation,tubular,cystic		1	0	0	1
minimal		1	0	0	1
Regeneration,tubular		2	0	0	1
minimal		2	0	0	1
Urinary cast,hyaline		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Mineralization		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Liver					
Number examined		11	11	11	11
Not remarkable		10	10	8	0
Hepatodiaphragmatic nodule		0	0	1	0
mild		0	0	1	0
Hematopoiesis,extramedullary		0	0	0	8
minimal		0	0	0	7
mild		0	0	0	1
Microgranuloma		1	1	2	2
minimal		1	1	2	2
Pigmentation,Kupffer cell		0	0	0	4
minimal		0	0	0	4
Lung(bronchus)					
Number examined		0	0	0	1
Hemorrhage,focal		0	0	0	1
minimal		0	0	0	1
Mammary gland					
Number examined		0	0	0	1
ADENOCARCINOMA		0	0	0	1
present		0	0	0	1
Ovary					
Number examined		11	0	0	11
Not remarkable		11	0	0	11
Spleen					
Number examined		11	11	11	11
Brown pigment,increased		0	0	2	3
minimal		0	0	2	1
mild		0	0	0	2
Hematopoiesis,extramedullary		11	11	11	11
minimal		2	2	2	0
mild		8	5	8	8
moderate		1	4	1	3
Congestion		0	0	0	11
minimal		0	0	0	5
mild		0	0	0	6
Uterus					
Number examined		11	0	0	11
Not remarkable		11	0	0	11
Vagina					
Number examined		11	0	0	11
Not remarkable		11	0	0	11

F : Female

Table 6-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline
 Histopathological findings (Undelivered)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 1	F 5 1	F 25 1
Findings				
Kidney				
Number examined		1	1	1
Not remarkable		1	0	1
Regeneration, tubular		0	1	0
mild		0	1	0
Liver				
Number examined		1	1	1
Not remarkable		1	1	0
Pigmentation, Kupffer cell		0	0	1
minimal		0	0	1
Ovary				
Number examined		1	1	1
Not remarkable		1	1	1
Spleen				
Number examined		1	1	1
Not remarkable		1	0	0
Brown pigment, increased		0	1	1
mild		0	1	1
Hematopoiesis, extramedullary		0	0	1
mild		0	0	1
Congestion		0	0	1
mild		0	0	1
Uterus				
Number examined		1	1	1
Not remarkable		1	1	1
Vagina				
Number examined		1	1	1
Not remarkable		1	1	1

F : Female

Table 6-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline
 Histopathological findings (All littermates died)

Organs	Sex:	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	1 1
Kidney		
Number examined		1
Not remarkable		1
Liver		
Number examined		1
Not remarkable		1
Ovary		
Number examined		1
Not remarkable		1
Spleen		
Number examined		1
Not remarkable		1
Uterus		
Number examined		1
Not remarkable		1
Vagina		
Number examined		1
Not remarkable		1

F : Female

Table 7

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline

Estrous cycle in female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus					Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4	
0	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5
1	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5
5	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5
25	12	0	0	0	9	3	3.3±0.5

No significant difference in any treated groups from control group

Table 8

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Mating and fertility of animals

Dose mg/kg	Male				Female			
	No. of males	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Insemination index (%) b)	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) c)
0	12	2.9±3.3	12/12(100.0)	11/12(91.7)	12	2.9±3.3	12/12(100.0)	11/12(91.7)
1	12	2.3±1.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.3±1.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)
5	12	2.4±2.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.4±2.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)
25	12	2.1±1.4	12/12(100.0)	11/12(91.7)	12	2.1±1.4	12/12(100.0)	11/12(91.7)

a): (No. of copulated animals / No. of mated animals) × 100

b): (No. of males which impregnated females / No. of copulated males) × 100

c): (No. of pregnant females / No. of copulated females) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 9

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Delivery data on dams

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females with liveborns	Delivery index % a)	Gestation length in days	No. of corpora lutea	No. of implan- tation sites	Implan- tation index % b)	No. of stillborns (%)c)	No. of liveborns	Live birth index % d)
0	Total	11	11	100.0		171	169		2	155	
	Mean				21.9	15.5	15.4	98.9	(1.7)	14.1	91.0
	S.D.				0.3	2.2	2.2	2.5	(4.0)	2.8	9.3
1	Total	12e)	11	91.7		194	189		20	159	
	Mean				22.1	16.2	15.8	97.7	(9.5)	13.3	85.4
	S.D.				0.7	2.2	1.7	3.5	(28.6)	4.6	27.6
5	Total	12f)	11	91.7		171	165		1	155	
	Mean				21.7	15.5	15.0	96.3	(0.5)	14.1	93.9
	S.D.				0.5	1.3	1.7	4.6	(1.8)	1.7	3.7
25	Total	11	11	100.0		177	172		3	162	
	Mean				21.7	16.1	15.6	97.4	(1.9)	14.7	94.0
	S.D.				0.5	1.5	1.2	3.8	(4.4)	1.8	7.1

a): (No. of females which delivered liveborns / No. of pregnant females) × 100

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

c): (No. of stillborns / No. of liveborns and stillborns) × 100

d): (No. of liveborns / No. of implantation sites) × 100

e): All pups in one dam were stillborn.

f): One dam was not delivered.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 10

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline

Sex ratio and external examination of pups

Dose mg/kg	No. of dams		Liveborns		Sex ratio of liveborns at birth a)	Day 4		Sex ratio of live pups on day 4 b)	External c) abnor- malities (%)d)
			No. of males	No. of females		No. of males	No. of females		
0	11	Total	68	87		68	85		1e)
		Mean	6.2	7.9	0.43	6.2	7.7	0.44	(0.6)
		S.D.	2.4	2.3	0.13	2.4	2.3	0.13	(2.0)
1	11	Total	77	82		74	80		0
		Mean	7.0	7.5	0.49	6.7	7.3	0.49	(0.0)
		S.D.	1.4	2.0	0.09	1.3	2.1	0.09	(0.0)
5	11	Total	84	71		82	68		0
		Mean	7.6	6.5	0.54	7.5	6.2	0.54	(0.0)
		S.D.	2.4	1.8	0.12	2.4	1.6	0.12	(0.0)
25	11	Total	85	77		83	77		0
		Mean	7.7	7.0	0.52	7.5	7.0	0.52	(0.0)
		S.D.	2.1	1.9	0.12	2.0	1.9	0.12	(0.0)

a): No. of liveborn males / No. of liveborns

b): No. of live males on day 4 / No. of live pups on day 4

c): No. of liveborns with external abnormalities

d): (No. of liveborns with external abnormalities / No. of liveborns) × 100

e): Acaudia

No significant difference in any treated groups from control group

Table 11 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Ethylaniline

Viability index of pups

Dose mg/kg		No. of dams	No. of live pups		Viability index on postnatal day 4 % a)
			Day 0	Day 4	
0	Total	11	154 ^{b)}	153	
	Mean		14.0	13.9	99.4
	S.D.		2.8	2.8	2.0
1	Total	11	159	154	
	Mean		14.5	14.0	97.0
	S.D.		2.1	1.9	3.5
5	Total	11	155	150	
	Mean		14.1	13.6	96.6
	S.D.		1.7	1.9	3.9
25	Total	11	162	160	
	Mean		14.7	14.5	98.9
	S.D.		1.8	1.6	2.4

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

b): One pup with external abnormalities was excluded.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 12

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Ethylaniline

Body weight of pups

Dose mg/kg		Male			Female		
		0	4a)	Gain	0	4a)	Gain
0	No.	11	11	11	11	11	11
	Mean	6.5	9.9	3.4	6.1	9.4	3.3
	S.D.	0.5	1.2	0.9	0.4	1.0	0.8
1	No.	11	11	11	11	11	11
	Mean	6.8	10.0	3.2	6.3	9.3	3.0
	S.D.	0.4	0.6	0.4	0.5	0.6	0.4
5	No.	11	11	11	11	11	11
	Mean	6.4	9.7	3.3	5.9	9.1	3.2
	S.D.	0.5	1.2	0.9	0.4	1.4	1.1
25	No.	11	11	11	11	11	11
	Mean	6.4	9.5	3.1	6.0	8.9	2.9
	S.D.	0.4	1.1	0.8	0.4	1.1	0.8

Unit: g

No.: No. of dams

a): Postnatal day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 13 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
 with N-Ethylaniline
 Gross pathological findings in pups on postnatal day 4

	Dose (mg/kg)	0	1	5	25
Male					
No. of pups examined		68	74	82	83
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0
Female					
No. of pups examined		85	80	68	77
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0