

最終報告書

4-アミノフェノールのラットを用いる
経口投与簡易生殖試験

試験施設 : 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ

1. 目次

1. 目次.....	1
3. 試験実施概要.....	7
3.1. 表題.....	7
3.2. 試験番号.....	7
3.3. 試験目的.....	7
4. 要約.....	11
4.1. 反復投与毒性.....	11
4.2. 生殖発生毒性.....	12
5. 試験材料及び方法.....	13
5.1. 被験物質及び媒体.....	13
5.1.1. 被験物質.....	13
5.1.2. 媒体.....	15
5.2. 試験系.....	16
5.2.1. 種及び系統.....	16
5.2.2. 試験系選択の理由.....	16
5.2.3. 購入動物数及び性別.....	16
5.2.4. 供給源.....	16
5.2.5. 生産場.....	16
5.2.6. 週齢.....	16

5.2.7. 入荷時体重範囲.....	16
5.2.8. 検疫, 馴化.....	16
5.2.9. 検疫馴化期間中の識別方法.....	17
5.2.10. 群分け.....	17
5.2.11. 群分け後の識別方法.....	17
5.3. 試験系の環境条件.....	17
5.3.1. 飼育環境.....	17
5.3.2. 飼料.....	18
5.3.3. 飲水.....	18
5.3.4. 床敷.....	19
5.3.5. 飼育器材の交換頻度.....	19
5.3.6. 洗浄及び消毒.....	19
5.4. 被験物質と媒体との混合物の調製法及び調製頻度.....	19
5.4.1. 調製法.....	19
5.4.2. 調製頻度.....	20
5.4.3. 混合物中での被験物質の安定性及び均一性.....	20
5.4.4. 投与液の識別法.....	20
5.5. 投与液中の被験物質濃度測定.....	20
5.5.1. 標準物質(被験物質を使用した).....	21
5.5.2. 試薬.....	22
5.5.3. 50 mmol/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム溶液(pH2.5)の調製.....	22
5.5.4. 移動相の調製.....	22
5.5.5. 希釈溶媒の調製.....	23
5.5.6. 標準試料溶液の調製.....	23
5.5.7. 測定実測試料の調製.....	23
5.5.8. 濃度測定.....	23
5.5.9. 濃度の算出法.....	24
5.5.10. データの取扱い.....	24
5.5.11. 再測定.....	24
5.6. 投与方法, 投与量及び群構成.....	25
5.6.1. 投与経路.....	25

5.6.2. 投与経路の選択理由	25
5.6.3. 投与方法	25
5.6.4. 投与時刻	25
5.6.5. 投与回数及び投与期間	25
5.6.6. 投与量	25
5.6.7. 投与量設定の根拠	25
5.6.8. 群構成	26
5.7. 観察、検査及び測定の頻度並びに方法	26
5.7.1. 雄動物の観察、測定及び検査	26
5.7.2. 雌動物の観察、測定及び検査	27
5.7.3. F ₁ 出産児の観察	29
5.8. 試験途中の死亡例及び瀕死例の処置	29
5.9. 統計学的処理	30
5.9.1. 親動物	30
5.9.2. F ₁ 出生児	30
5.10. 動物の適正使用	31
6. 試験結果	32
6.1. 反復投与毒性	32
6.1.1. 一般状態	32
6.1.2. 体重	32
6.1.3. 摂餌量	33
6.1.4. 剖検	33
6.1.5. 器官重量	33
6.1.6. 病理組織学検査	34
6.2. 生殖発生毒性	35
6.2.1. 性周期検査及び生殖能力検査	35
6.2.2. 分娩及び哺育期(哺育 4 日まで)検査並びに新生児検査	35
7. 考察	36
7.1. 反復投与毒性	36
7.2. 生殖発生毒性	37

Fig. 1	Mean body weight changes of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	39
Fig. 2	Mean body weight changes of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	40
Fig. 3	Mean food consumption of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	41
Fig. 4	Mean food consumption of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	42
Table 1	Clinical signs of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	43
Table 2	Clinical signs of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	47
Table 3	Body weights of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	54
Table 4	Body weights of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	55
Table 5	Food consumption of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	57
Table 6	Food consumption of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	58
Table 7	Necropsy findings of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	60
Table 8	Necropsy findings of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test - Dead	61
Table 9	Necropsy findings of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	62
Table 10	Necropsy findings of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test – Unscheduled sacrifice.....	63
Table 11	Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	64

Table 12 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	65
Table 13 Histopathological findings of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	66
Table 14 Histopathological findings of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test - Dead.....	67
Table 15 Histopathological findings of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test - Immunohistochemistry for α 2u-globulin.....	68
Table 16 Histopathological findings of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	69
Table 17 Histopathological findings of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test - Unscheduled sacrifice	70
Table 18 Histopathological findings of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test - Immunohistochemistry for α 2u-globulin.....	71
Table 19 Reproductive performance of rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	72
Table 20 Terminal delivery of F0 dams treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test	73

3. 試験実施概要

3.1. 表題

4-アミノフェノールのラットを用いる経口投与簡易生殖試験

3.2. 試験番号

P041490

3.3. 試験目的

4-アミノフェノールの安全性に関する毒性試験の一環として, 4-アミノフェノールを雌雄ラットに反復経口投与し, 反復投与毒性及び生殖発生毒性について検討した.

4. 要約

OECD 既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、4-アミノフェノールの0(媒体対照), 20, 100 及び 500 mg/kg/day を Crl:CD (SD) ラットの雌雄(各 12 匹/群)に交配前 14 日間, 雄ではその後交配期間を含む 35 日間, 雌では交配期間, 妊娠期間及び哺育 3 日まで通して経口投与し, 親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

4.1. 反復投与毒性

500 mg/kg 群で投与 3~5 日に雄 4 例及び投与 4~25 日に雌 2 例が死亡した。死亡例では, 死亡に至るまでに自発運動の低下, 緩徐呼吸, 腹臥位, 褐色尿, 皮膚蒼白, 眼球蒼白, 体温低下及び横臥位が認められた。生存例では, 100 及び 500 mg/kg 群の雌雄で褐色尿が投与 3 日以降に, 全例でみられ, 500 mg/kg 群の雌 1 例で自発運動の低下及び緩徐呼吸が投与 7 日に認められた。また, 500 mg/kg 群の雌雄では体重及び摂餌量の低値がみられ, 100 mg/kg 群の雌においても摂餌量の低値が認められた。

剖検では, 500 mg/kg 群の死亡例の雄で腎臓の褪色及び肥大, 雌で胸腺の小型化, 膀胱の赤色尿貯留及び腎臓の黒褐色化が認められた。生存例では, 500 mg/kg 群の雄で脾臓の黒褐色化, 腎臓の褪色及び精巣の小型化が認められた。更に, 未交尾例及び全児死亡例の雌では, 500 mg/kg 群で脾臓の黒褐色化が認められた。器官重量では, 雄の 500 mg/kg 群で精巣及び精巣上体の絶対重量及び相対重量に低値が認められた。

病理組織学検査では, 500 mg/kg 群の死亡例の雌雄で腎臓にタンパク円柱, 好塩基性尿細管及び尿細管の壊死がみられ, この尿細管の壊死が死亡原因と考えられた。更に, 腎臓では雌雄で近位尿細管上皮細胞の褐色顆粒の沈着がみられ, ベルリン青染色陰性, シュモール反応陽性を示したことから, 消耗性色素と考えられた。また, 500 mg/kg 群の死亡例の雄では, 精巣の精母細胞の変性/壊死及びセルトリ細胞の空胞化がみられ, 死亡例の雌では, 胸腺の萎縮が認められた。生存例では, 500 mg/kg 群の雄で腎臓に好塩基性尿細管, タンパク円柱及び顆粒円柱が認められた。更に, 500 mg/kg 群の雄で精巣の精母細胞及び精子細胞の減少, 精母細胞の変性/壊死及びセルトリ細胞の空胞化がみられ, 精巣上体の管腔内の生殖細胞残渣及び精子の減少が認められた。また, 500 mg/kg 群の生存例の雄, 未交尾例の雌及び全児死亡例の雌では, 脾臓に赤脾髄のヘモジデリン沈着がみられ, 生存例の雄及び未交尾例の雌では, 脾臓に髄外造血が認められた。上述した精巣, 精巣上体及び脾臓でみられた変化では, いずれも発現頻度の増加が認められた。

以上のように, 100 及び 500 mg/kg 群で被験物質投与による影響が認められていることから, 本

試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄とも 20 mg/kg/day と推察された。

4.2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、平均発情回数及び平均発情周期に変化はみられなかったが、500 mg/kg 群の 4 例で性周期の回帰が停止した。また、500 mg/kg 群では、妊娠期間が延長し、分娩及び哺育行動の不良がほぼ全例で認められた。交尾所要日数、交尾率、受胎率、黄体数、着床痕数、着床率及び出産率では、被験物質投与の影響は認められなかった。児動物に関しては、500 mg/kg 群で死産率の高値、出生率の低値及び新生児の生後 4 日の生存率に低値が認められた。更に、500 mg/kg 群では生後 0 及び 4 日の雌雄新生児体重に低値が認められた。出産児数、新生児数、新生児の性比、外表異常率及び型別外表異常児出現率では、被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のように、500 mg/kg 群で親動物の生殖能力及び次世代児への影響が認められた。したがって、本試験条件下における親動物の生殖能力及びに次世代児に関する無影響量は、親動物及び児動物ともに 100 mg/kg/day と推察された。

5. 試験材料及び方法

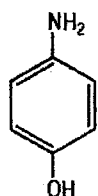
5.1. 被験物質及び媒体

5.1.1. 被験物質

5.1.1.1. 名称

4-アミノフェノール (4-Aminophenol)

5.1.1.2. 構造式



5.1.1.3. ロット番号

5.1.1.4. CAS 番号

123-30-8

5.1.1.5. 入手量

900 g

5.1.1.6. 購入日

2005 年 6 月 7 日

5.1.1.7. 製造元

5.1.1.8. 性状

白色～うすい黄色の結晶性粉末

5.1.1.9. 純度

99.0 %

5.1.1.10. 安定性

投与終了後に被験物質を下記の施設に送付して分析を行い、安定性を確認した(添付資料 1 及び 2).

株式会社三菱化学安全科学研究所 北九州研究所

福岡県北九州市八幡西区黒崎城石 1 番 1 号 (〒806-0004)

TEL 096-643-2770, FAX 093-643-2059

5.1.1.11. 保存条件及び保存場所

アルゴン充填後、気密容器を密栓し、冷所、遮光下で分配前(2005 年 6 月 7 日～2005 年 9 月 22 日)は被験物質(62)の冷凍冷蔵庫及び低温室(61)、分配後(2005 年 9 月 22 日～2006 年 2 月 14 日)は低温室(61)に保存した。但し、2005 年 6 月 22 日～2005 年 9 月 13 日の間は、アルゴン充填を行っていなかったが、投与終了後の安定性に問題は認められなかった。

試験分配前の実測温度：被験物質(62)の冷凍冷蔵庫；2～5℃

低温室(61) ; 2～7℃

試験分配後の実測温度：低温室(61) ; 2～8℃

5.1.1.12. 取扱い注意事項

保護メガネ、マスク及びゴム手袋を着用し、皮膚に付着しないよう注意した。

5.1.1.13. 保存用被験物質

使用ロットから 5 g 採取して保存した。

5.1.1.14. 残余の被験物質

廃棄処分した。

5.1.2. 媒体

5.1.2.1. 名称

0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム(0.5% CMC-Na)水溶液

5.1.2.2. 原末の名称

Carboxymethylcellulose sodium salt (CMC-Na), Medium viscosity

5.1.2.3. 原末のロット番号

044K0101

5.1.2.4. 原末の入手量

200 g

5.1.2.5. 原末の製造元

SIGMA-ALDRICH

5.1.2.6. 原末の性状

淡黄褐色の粉末

5.1.2.7. 保存条件及び保存場所

被験物質室(61)の保管庫に室温で保存した。

5.1.2.8. 媒体の調製方法及び調製頻度

CMC-Na 原末を注射用水 [株式会社大塚製薬工場(ロット番号: 5E00)] に溶解して 0.5 w/v%水溶液とした。週 1~2 回の頻度で調製した。

5.1.2.9. 取扱い注意事項

特になし

5.2.9. 検疫馴化期間中の識別方法

入荷時に、動物には飼育ケージ内での識別を行うために、油性フェルトペンにて尾に識別番号を記入するとともに、試験番号、検疫動物番号及び性別を表示したラベルを各ケージの前面に付けた。

5.2.10. 群分け

投与開始前日に、その日の体重を基に層別連続無作為化法で群分けを行い、平均体重の 20 % 以内の動物を使用した。また、雌については性周期が正常に回帰している動物を使用した。なお、残余の動物は試験から除外した。

5.2.11. 群分け後の識別方法

動物番号を刻印した耳標を取り付けるとともに、試験番号、動物番号、投与量及び性別を表示したラベルを各ケージの前面に付けた。

5.3. 試験系の環境条件

5.3.1. 飼育環境

5.3.1.1. 飼育室番号

バリアーシステム C 区域内の飼育室 91 番

5.3.1.2. 飼育ケージ

ステンレススチール製 (W260 × H200 × D380 mm)

ポリメチルペンテン製 (W265 × H185 × D425mm)

5.3.1.3. ケージ架台

ステンレススチール製ケージ用 (W1300 × H1550 × D450 mm)

ポリメチルペンテン製ケージ用 (W1500 × H1550 × D450mm)

5.3.1.4. 収容動物数

検疫馴化期間中は 1 ケージ当たり 1~3 匹、群分け後は 1 ケージ当たり 1 匹

5.3.1.5. 温度

23～27℃（許容範囲 21～27℃）

5.3.1.6. 湿度

51～61%（許容範囲 35～75%）

5.3.1.7. 照明

午前 7 時点灯，午後 7 時消灯の 12 時間

5.3.1.8. 換気回数

10～20 回／時

5.3.2. 飼料

5.3.2.1. 種類

固型飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業株式会社）

5.3.2.2. 滅菌方法

高圧蒸気滅菌

5.3.2.3. 給餌方法

自由摂取

5.3.2.4. 分析

オリエンタル酵母工業株式会社が財団法人 日本食品分析センターに委託して実施したロットごとの分析結果を入手し，飼料中の夾雑物が株式会社パナファーム・ラボラトリーズの許容基準値を満たしていることを確認した。

5.3.3. 飲水

5.3.3.1. 種類

井戸水

5.3.3.2. 消毒方法

次亜塩素酸ナトリウムを添加（約 2 ppm）

5.3.3.3. 給水方法

自由摂取（自動給水装置又は給水瓶）

5.3.3.4. 分析

水質検査を 6 ヶ月ごとに株式会社鶴城に依頼し、その分析結果が水道法水質基準に適合していることを確認した。

5.3.4. 床敷

5.3.4.1. 種類

ホワイトフレーク（日本チャールス・リバー株式会社）

5.3.4.2. 滅菌方法

高圧蒸気滅菌

5.3.5. 飼育器材の交換頻度

ケージ架台	: 4 週間に 1~2 回交換
ステンレススチール製ケージ	: 2 週間に 1 回交換
ポリメチルペンテン製ケージ	: 1 週間に 1~2 回交換
受皿	: 1 週間に 2~3 回交換(但し、交配中の雄は毎日)
給水瓶	: 1 週間に 3~5 回交換

5.3.6. 洗浄及び消毒

飼育器材は水洗後オートクレーブ滅菌した。飼育室は毎日清掃し、消毒薬を浸したモップで清拭した。消毒薬には次亜塩素酸ナトリウム及び逆性石けんを用い、1 週間ごとに交換した。

5.4. 被験物質と媒体との混合物の調製法及び調製頻度

5.4.1. 調製法

調製は以下の手順で行った。

- 1) 被験物質を正確に必要量秤量し、慎重にメノウ製乳鉢に入れた。
- 2) 被験物質を乳棒で十分に摩砕した。少量の媒体を加え懸濁した。
- 3) 良好な懸濁状態になったのを確認後、メスシリンダーに移した。
- 4) 少量の媒体をメノウ製乳鉢内に入れ、乳棒で軽にかき混ぜてメスシリンダーに移した。この操作を数回繰り返し完全に洗いこんだ。
- 5) 媒体を加え、調製液量にメスアップし、50, 10 及び 2 mg/mL 懸濁液を調製した。
- 6) 転倒混和し、ガラス容器に移しアルミ箔にて遮光した。

5.4.2. 調製頻度

使用時に調製した。

5.4.3. 混合物中での被験物質の安定性及び均一性

0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム懸濁液中 4-アミノフェノールの均一性及び安定性試験(試験番号：P050089, 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ)において、冷所、遮光下で調製 1 日+室温、遮光下 6 時間後までの、2 及び 50 mg/mL 混合液の安定性及び均一性を確認した(添付資料 4)。

5.4.4. 投与液の識別法

投与液を入れたガラス容器に、試験番号、被験物質名、被験物質濃度、投与量、調製日及び調製者名を記入したラベルを貼付した。

5.5. 投与液中の被験物質濃度測定

初回調製時にすべての濃度の投与液について、調製した投与液総量からそれぞれ約 30mL 採取し、下記に示す方法に従って株式会社パナファーム・ラボラトリーズで測定した。なお、定量値は規定された濃度の $\pm 10\%$ 以内とした(添付資料 3)。

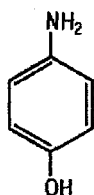
測定方法は、0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム懸濁液中 4-アミノフェノールの濃度測定法バリデーション試験(試験番号:P041534, 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ)で確立された方法に基づき実施した。

5.5.1. 標準物質(被験物質を使用した)

5.5.1.1. 名称

4-アミノフェノール (4-Aminophenol)

5.5.1.2. 構造式



5.5.1.3. ロット番号

AGN02

5.5.1.4. CAS 番号

123-30-8

5.5.1.5. 入手量

1000 mg

5.5.1.6. 製造元

東京化成工業株式会社

5.5.1.7. 性状

白色～うすい黄色の結晶性粉末

5.5.1.8. 純度

99.0 %

5.5.1.9. 保存条件及び保存場所

アルゴン充填後、気密容器を密栓し、冷所、遮光下で分配前(2005年6月7日～2005年9月22日)は被験物質(62)の冷凍冷蔵庫及び低温室(61)、分配後(2005年9月22日～2006年2月14日)は低温室(61)に保存した。但し、2005年6月22日～2005年9月13日の間は、アルゴン充填を行っていなかったが、投与終了後の安定性に問題は認められなかった。

試験分配前の実測温度：被験物質(62)の冷凍冷蔵庫；2～5℃

低温室(61)；2～7℃

試験分配後の実測温度：低温室(61)；2～8℃

5.5.1.10. 取扱い注意事項

保護メガネ、マスク及びゴム手袋を着用し、皮膚に付着しないよう注意した。

5.5.1.11. 残余の標準物質

廃棄処分した。

5.5.2. 試薬

メタノール(HPLC 用)：和光純薬工業株式会社

1-オクタンスルホン酸ナトリウム(イオンペア試薬用)

：東京化成工業株式会社

リン酸(試薬特級)：和光純薬工業株式会社

純水：株式会社パナファーム・ラボラトリーズにおいて、超純水製造装置システム(型式 ELIX. ASM. MILLI-Q, MILLIPORE)により精製した。

5.5.3. 50 mmol/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム溶液(pH2.5)の調製

1-オクタンスルホン酸ナトリウム 10.8 g を約 900 mL の純水に溶かし、リン酸で pH2.5 に調整後、純水を加えて 1000 mL とした[50 mmol/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム溶液(pH2.5)]。

5.5.4. 移動相の調製

メタノール 3 容に 50 mmol/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム溶液(pH2.5) 7 容を加えて混合し、移動相とした。

5.5.5. 希釈溶媒の調製

メタノール 7 容に純水 3 容を加えて混合し、希釈溶媒とした。

5.5.6. 標準試料溶液の調製

標準物質 100 mg を正確に量り、希釈溶媒を加えて正確に 100 mL とした。この液 2 mL を正確に量り、希釈溶媒を加えて正確に 100 mL とし、標準試料溶液とした(20 µg/mL)。調製は測定日毎に行った。

5.5.7. 測定実測試料の調製

(1) 50 mg/mL 投与液

50 mg/mL 投与液の試料を攪拌しながら、任意の 2 ヶ所よりそれぞれ 1 mL を正確に量り、希釈溶媒を加えて正確に 100 mL とした。この液 2 mL を正確に量り、希釈溶媒を加えて正確に 50 mL とした。

(2) 10 mg/mL 投与液

10 mg/mL 投与液の試料を攪拌しながら、任意の 2 ヶ所よりそれぞれ 1 mL を正確に量り、希釈溶媒を加えて正確に 50 mL とした。この液 2 mL を正確に量り、希釈溶媒を加えて正確に 20 mL とした。

(3) 2 mg/mL 投与液

2 mg/mL 投与液の試料を攪拌しながら、任意の 2 ヶ所よりそれぞれ 1 mL を正確に量り、希釈溶媒を加えて正確に 100 mL とした。

5.5.8. 濃度測定

5.5.7.項に従って調製した測定実測試料を、下記的高速液体クロマトグラフィー(HPLC)条件でそれぞれ 1 回分析した。

[HPLC 条件]

送液ユニット	: LC-10ADVP2 台 (株式会社島津製作所)
UV/VIS 検出器	: SPD-10AVP (株式会社島津製作所)
システムコントローラ	: SCL-10AVP (株式会社島津製作所)
オートインジェクタ	: SIL-10ADVP (株式会社島津製作所)
カラムオープン	: CTO-10ACVP (株式会社島津製作所)
オンラインデガッサ	: DGU-14A (株式会社島津製作所)

データ処理ソフト	: CLASS-VP (株式会社島津製作所)
検出波長	: UV 220 nm
カラム	: CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6 mm I.D.×150 mm, 5 μm, 株式会社資生堂)
カラム温度	: 40°C 付近の一定温度 (設定温度: 40°C)
移動相	: メタノール/50 mmol/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム溶液(pH2.5) 混液(3:7)
流量	: 1.0 mL/min
注入量	: 20 μL
オートサンプラー温度	: 25°C

5.5.9. 濃度の算出法

自動積分により得られたピーク面積より、下記の計算式を用いて投与液中の被験物質濃度を算出した。

$$\text{投与液中被験物質濃度(mg/mL)} = \text{標準試料溶液濃度(μg/mL)} / 1000 \times (A_T / A_S) \times D$$

A_T : 測定実測試料における被験物質のピーク面積

A_S : 標準試料溶液における標準物質のピーク面積

D : 希釈係数; 100 (2 mg/mL), 500 (10 mg/mL), 2500 (50 mg/mL)

5.5.10. データの取扱い

秤量値及びピーク面積は表示値を使用した。被験物質濃度及びその平均値は有効数字 4 桁目を四捨五入して有効数字 3 桁とした。パーセントで表す結果はいずれも小数点以下 2 桁目を四捨五入し、小数点以下 1 桁とした。

5.5.11. 再測定

実施しなかった。

5.6. 投与方法、投与量及び群構成

5.6.1. 投与経路

経口投与

5.6.2. 投与経路の選択理由

「OECD 毒性試験ガイドライン」で指定されている投与経路であり、予想されるヒトへの暴露経路の一つであるため。

5.6.3. 投与方法

胃管（RZ-1，テフロン製，日本クレア株式会社）を用いて強制経口投与した。投与中は投与液をスターラーで攪拌した。

5.6.4. 投与時刻

午前中に投与した。

5.6.5. 投与回数及び投与期間

雄は交配前 14 日間及びその後 35 日間の合計 49 日間，雌は交配前 14 日間，交配期間（交尾成立までの最長 14 日間），妊娠期間及び哺育 3 日までの期間，それぞれ 1 日 1 回連日投与した。「OECD 毒性試験ガイドライン」に準じた。なお，投与開始日を投与 1 日とした。

5.6.6. 投与量

20, 100 及び 500 mg/kg とした。投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には同容量の媒体を投与した。投与液量は，雄並びに交配前及び交配期間中の雌については最新体重を基に，交尾成立後の雌については妊娠 0 日及び分娩 0 日の体重を基にそれぞれ算出した。

5.6.7. 投与量設定の根拠

本試験に先立って実施した 28 日間反復経口投与毒性試験(株式会社三菱化学安全科学研究所鹿島研究所，投与量;4, 20, 100 及び 500 mg/kg)¹⁾の結果から設定した。その結果，500 mg/kg 群では，雄 1 例が死亡し，生存例の一般状態で自発運動の減少がみられ，体重，摂餌量，尿検査，血液学検査，血液生化学検査及び病理学検査で被験物質投与に起因したと考えられる変化が認められた。100 mg/kg 群において，病理学検査で被験物質投与に起因したと考えられる変化がみられたが，軽

微な変化であった。4 及び 20 mg/kg 群では被験物質投与による影響は認められなかった。したがって、本試験では被験物質投与による影響が認められる 500 mg/kg を高用量とし、以下公比 5 で除した 100 mg/kg 及び 20 mg/kg を中用量及び低用量に設定した。

5.6.8. 群構成

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性別	使用動物数 総数	動物番号
対照 ^a	0	0	10	雄	12	101~112
				雌	12	151~162
低用量	20	2	10	雄	12	113~124
				雌	12	163~174
中用量	100	10	10	雄	12	125~136
				雌	12	175~186
高用量	500	50	10	雄	12	137~148
				雌	12	187~198

a：媒体を投与

5.7. 観察、検査及び測定の頻度並びに方法

5.7.1. 雄動物の観察、測定及び検査

5.7.1.1. 一般状態

投与期間中は毎日投与前、投与直後及び投与後 1～3 時間の 3 回、一般状態の観察及び生死の確認を行った。

5.7.1.2. 体重

投与期間を通して週 2 回の頻度で測定した。

5.7.1.3. 摂餌量

投与期間を通して週 2 回の頻度で測定した。但し、交配期間は測定しなかった。午前中に飼料を入れた給餌器を秤量してケージにセットし、翌日の午前中に給餌器をケージから取り出して残量を秤量した。なお、摂餌量の表示は残量の測定日とした。

5.7.1.4. 剖検

最終投与の翌日に、エーテル麻酔下で外側腸骨動脈切断により放血致死させ、速やかに解剖してすべての器官及び組織について異常の有無を綿密に検査した。

5.7.1.5. 器官重量の測定

剖検後、精巣及び精巣上体の器官重量を測定し、剖検日の体重を基に体重比器官重量を算出した。

5.7.1.6. 病理組織学検査

精巣、精巣上体並びに肉眼的に異常がみられた肝臓、脾臓及び腎臓については、10 vol%中性緩衝ホルマリン溶液（但し、精巣及び精巣上体はブアン液で前固定）で固定して保存した。対照群及び被験物質各投与群の精巣、精巣上体及び肉眼的に異常がみられた肝臓、脾臓及び腎臓についてはパラフィン切片としたのち、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検を実施した。未交尾及び交尾不妊の雄の精巣及び精巣上体についても病理組織学検査を行った。なお、脾臓については、褐色色素の沈着が認められ、ヘモジデリンが疑われたため、ヘマトキシリン・エオジン染色に加え、ベルリン青染色及びシュモール反応を実施して鏡検した。更に、腎臓の近位尿細管上皮細胞の硝子滴が認められた500 mg/kg群の3例について、 α_{2u} -グロブリンの免疫染色を実施した。

5.7.2. 雌動物の観察、測定及び検査

5.7.2.1. 一般状態

投与期間中は毎日投与前、投与直後及び投与後1～3時間の3回、一般状態の観察及び生死の確認を行った。

5.7.2.2. 体重

交配前の投与期間及び交配期間は週2回、妊娠期間は妊娠0、7、14及び20日、哺育期間中は哺育0（分娩日）及び4日に測定した。

5.7.2.3. 摂餌量

交配前の投与期間は週2回、妊娠期間は妊娠1、7、14及び20日、哺育期間中は哺育1（分娩翌日）及び4日に測定した。測定方法は5.7.1.3.項に準じた。

5.7.2.4. 性周期検査

雌の投与開始日から交尾確認日あるいは交配期間終了まで毎日午前の一定時間に綿棒にて膺垢を採取し、性周期の観察を行った。性周期は休止期（D）、発情前期（P）、発情期（E）及び発情後期（M）に分類し、検査期間中における発情期（E）から次の発情期（E）までの平均日数及び

発情回数を算出した。なお、500 mg/kg 群の 1 例(No.191)が投与 4 日に死亡したため、性周期検査の評価から除外した。また、交配期間中の成績は参考データとした。

5.7.2.5. 生殖能力検査

交配は、雌雄とも 12 週齢に達した時点から開始した。同一群内で雌雄各 1 匹ずつを一晩同居させ、翌朝膣垢中の精子又は膣栓が確認された雌を交尾成立とし、その日を妊娠 0 日として起算した。交配期間は最長 2 週間とした。これらの結果から、交尾所要日数 (交配開始後、交尾成立までに要した日数)、交尾率及び授(受)胎率を算出した。なお、500 mg/kg 群では交配前投与期間中に雄 4 例及び雌 1 例が死亡したため、雌 3 例が交配開始日より交配を開始できなかった。これらについては、同群内の交尾が認められた雄と交配開始後 4 及び 5 日に交配を開始した。また、交配期間中に 500 mg/kg 群の雌の 1 例が死亡したため、本例(No.187)及び交配相手の雄(No.141)は生殖能力検査の評価から除外した。

5.7.2.6. 分娩時検査及び哺育期検査

分娩徴候も含め分娩状態、分娩後の母動物の授乳、営巣などの哺育状態を観察するとともに、妊娠期間及び出産率を算定した。分娩時検査は午前中に分娩が終了したことを確認した動物について実施した。

5.7.2.7. 剖検

母動物は哺育 4 日にエーテル麻酔下で外側腸骨動脈切断により放血致死させ、速やかに解剖してすべての器官及び組織について異常の有無を綿密に検査するとともに、卵巣及び子宮を摘出し、黄体数及び着床痕数を算定した。哺育 4 日までに出生児の全例が死亡した母動物については速やかにエーテル麻酔下で外側腸骨動脈切断により放血致死させ剖検し、黄体数及び着床痕数を算定した。なお、交尾が認められなかった動物については雄の剖検日に、分娩しない動物については妊娠 24 日にエーテル麻酔下で外側腸骨動脈切断により放血致死させ剖検し、妊娠の有無を確認した。いずれの場合も卵巣及び肉眼的に異常がみられた脾臓については摘出したのち、10 vol%中性緩衝ホルマリン溶液に固定して保存した。

5.7.2.8. 器官重量の測定

剖検後、卵巣の器官重量を測定した。更に、剖検日の体重を基に体重比器官重量を算出した。

5.7.2.9. 病理組織学的検査

卵巣及び肉眼的に異常がみられた脾臓については、10 %中性緩衝ホルマリン溶液で固定して保存した。対照群及び高用量群の卵巣及び肉眼的に異常がみられた脾臓についてはパラフィン切片としたのち、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。未交尾、交尾不妊及び全児死亡の雌の卵巣についても病理組織学検査を行った。なお、脾臓については、褐色色素の沈着が認められ、ヘモジデリンが疑われたため、ヘマトキシリン・エオジン染色に加え、ベルリン青染色及びシュモール反応を実施して鏡検した。

5.7.3. F₁ 出産児の観察

5.7.3.1. 分娩時検査及び哺育期検査

哺育0日に出産児数、出生児数、死産児数、出生児性別、出生児体重及び出生児の外表検査を実施した。また、出生率を算出した。出生児の生死の確認を毎日行い、哺育4日に体重を測定するとともに、生存率を算出した。

5.7.3.2. 剖検

哺育4日にエーテル麻酔下で放血致死させ、器官・組織の肉眼的観察をした。剖検後、出生児の胸部及び腹部の器官・組織を取り除き、カーカスを純エタノールに一腹単位で固定保存した。また、死産児及び死亡児についても剖検し、カーカスを純エタノールに固定保存した。

5.8. 試験途中の死亡例及び瀕死例の処置

試験途中死亡例は速やかに剖検し、死因の検索を行った。その際、精巣、精巣上体、卵巣並びに肉眼的に異常がみられた肺、腎臓、胸腺、膀胱及び皮膚を摘出し、10 vol%中性緩衝ホルマリン溶液（但し、精巣及び精巣上体はブアン液で前固定）に固定保存した。精巣、精巣上体、卵巣並びに肉眼的に異常がみられた肺、腎臓、胸腺及び皮膚についてはパラフィン切片としたのち、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織学検査を実施した。腎臓については、褐色色素の沈着が認められ、ヘモジデリンが疑われたため、ヘマトキシリン・エオジン染色に加え、ベルリン青染色及びシュモール反応を実施して鏡検した。更に、500 mg/kg 群で腎臓の近位尿細管上皮細胞の硝子滴が認められた死亡例の雌1例について、 $\alpha_2\mu$ -グロブリンの免疫染色を実施した。なお、膀胱については、赤色尿の貯留がみられたが、膀胱自体に異常は認められなかったため、病理組織学検査は行わなかった。

5.9. 統計学的処理

下記の通り統計学的解析を行い、いずれの場合も有意水準を1及び5%とした。不妊例は評価の対象から除外した。

5.9.1. 親動物

5.9.1.1. 多重比較

体重、摂餌量、発情周期、発情回数、交尾所要日数、妊娠期間、器官重量及び体重比器官重量各群ごとに平均値と標準偏差を求め、分散の均一性を Bartlett 法により検定し、分散が均一な場合は、Dunnett の多重比較検定を用いて、異なる場合は Steel の多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。

5.9.1.2. Mann-Whitney の U 検定

病理組織学的検査

5.9.1.3. χ^2 検定

交尾率（交尾動物数／交配動物数）×100

受胎率（妊娠動物数／雌交尾動物数）×100

授胎率（妊娠動物数／雄交尾動物数）×100

出産率（生児出産雌数／妊娠雌数）×100

5.9.2. F₁ 出生児

5.9.2.1. 多重比較

着床痕数、黄体数、出産児数、出生児数、雌雄出生児体重（1腹ごとの平均値を1測定単位とした）。処理方法は5.9.1.1.項に準じた。

5.9.2.2. χ^2 検定

性比 : (雄出生児数/雌出生児数)

5.9.2.3. Wilcoxon の順位和検定法（両側検定）

着床率 : (着床数/黄体数) ×100

死産率 : (死産児数/出産児数) ×100

外表異常率 : (異常児数/検査児数) ×100

型別外表異常児出現率 : (型別異常児数/検査児数) ×100
出生率 : (出生児数/着床痕数) ×100
新生児の4日の生存率 : (哺育4日の生児数/出生児数) ×100

5.10. 動物の適正使用

動物は、株式会社パナファーム・ラボラトリーズの動物実験に関する指針に従い適切に使用した。

6. 試験結果

6.1. 反復投与毒性

6.1.1. 一般状態

一般状態所見を Table 1, 2 及び Appendix 1, 2 に示した。

500 mg/kg 群の雄で投与 3 日に 2 例(No.137 及び 145), 4 及び 5 日に各 1 例(No.147 及び 144), 雌で投与 4 及び 25 日に各 1 例(No.191 及び 187)が死亡した。これらの死亡例は、投与 3～5 日の投与前から雌雄全例で自発運動の低下及び緩徐呼吸、雄全例で腹臥位がみられ、早いもので投与後約 1 時間、遅いもので翌日の投与前に死亡した。これらのうち、雌雄各 2 例(雄 : No.144, 147 及び 雌 : No.187, 191)で褐色尿が投与 4 日の投与前の観察、雄 2 例(No.137 及び 145)で流涎が投与 3 日の投与直後の観察から認められた。更に、雌 1 例(No.187)では投与 11 日の投与前から皮膚蒼白及び眼球蒼白、投与 25 日の投与直後の観察から体温低下及び投与後 1～3 時間の観察から横臥位がみられたほか、投与 19 日以降に脱毛が認められた。

生存例では、100 及び 500 mg/kg 群で褐色尿が、雌雄とも投与 3 日以降の投与後 1～3 時間の観察から翌朝の投与前観察までの間に全例でみられ、500 mg/kg 群の雌 1 例(No.192)では、自発運動の低下及び緩徐呼吸が投与 7 日の投与後 1～3 時間に認められた。更に、500 mg/kg 群では流涎が雌雄とも投与 12 日以降の投与直後から投与後 1～3 時間の観察で、ほぼ全例で散発的に認められた。流涎は、死亡例及び生存例のいずれにもみられたが、投与後に発生する一過性の変化であり、生存例の投与期間終了後には認められなかったことから、被験物質の味等に起因した毒性学的意義のない変化と判断した¹⁾。そのほか、500 mg/kg 群の雌 1 例で脱毛が妊娠 2～10 日に認められた。脱毛については、死亡例及び生存例の雌の各 1 例でみられたが、出現例数も少なく、生存例では投与期間中に回復性が認められていることから、被験物質投与と関連性のない偶発的な変化と考えられた。なお、雌の妊娠期間以降は、床敷を敷き詰めたポリメチルペンテン製ケージに収容したことにより、尿の色調の観察が困難になったため、褐色尿は観察できなかった。

6.1.2. 体重

体重推移を Figure 1, 2, Table 3, 4 及び Appendix 3, 4 に示した。

雄では、500 mg/kg 群で投与期間を通して対照群と比較して有意な低値が認められた。

雌では、500 mg/kg 群で投与期間を通して低値傾向がみられ、投与 4～15 日及び妊娠 7 並びに 20 日に対照群と比較して有意な低値が認められた。更に、500 mg/kg 群では全児死亡例が多発し、統計学的評価を行えなかったが、哺育 4 日に明らかな低値が認められた。

6.1.3. 摂餌量

摂餌量を Figure 3, 4, Table 5, 6 及び Appendix 5, 6 に示した.

雄では, 500 mg/kg 群で投与 2~11 日に対照群と比較して有意な低値が認められた.

雌では, 100 mg/kg 群の投与 2~8 日及び 500 mg/kg 群の投与 2~11 日で対照群と比較して有意な低値が認められた. 更に, 500 mg/kg 群では全児死亡例が多発し, 統計学的評価を行えなかったが, 哺育 4 日に明らかな低値が認められた.

6.1.4. 剖検

剖検の結果を Table 7~10 及び Appendix 7, 8 に示した. なお, 文中の括弧内の値は(異常例数/検査例数)である.

生存例では, 500 mg/kg 群の雄 8 例(8/8 例)で脾臓の黒褐色化, 4 例(4/8 例)で腎臓の褪色, 1 例(1/8 例)で精巣の小型化がみられ, 20 及び 500 mg/kg 群の雄で精巣上体の黄白色結節が各 1 例(20 mg/kg 群: 1/12 例及び 500 mg/kg 群: 1/8 例)に認められた. 20 及び 500 mg/kg 群でみられた精巣上体の黄白色結節は, いずれも出現例数が少なく, 片側のみの変化であり, 投与用量に関連しない変化であることから, 被験物質投与との関連性のない変化と考えられた. そのほか, 対照群の雄 1 例(1/12 例)で肝臓の横隔膜ヘルニアが認められた. 雌の生存例では, 対照群及び被験物質各投与群で異常は認められなかった.

死亡例(500 mg/kg 群)では, 雄の全例(4/4 例)で腎臓の褪色及び肥大がみられ, このうち 1 例(1/4 例)では肺の暗赤色点, 胸水及び腹水の貯留が認められた. 更に, 雌の全例(2/2 例)で腎臓の黒褐色化がみられ, このうち 1 例(1/2 例)で, 胸腺の小型化, 膀胱の赤色尿の貯留及び脱毛, ほかの 1 例(1/2 例)で胸水の貯留が認められた. 肺の暗赤色点については, 死亡動物では非特異的な肺の暗赤色斑がみられることもあることから, 被験物質投与による特異的な変化とは断定できなかった.

未交尾例及び全児死亡例の雌では, 500 mg/kg 群の各 1 例(未交尾例: 1/1 例及び全児死亡例: 1/6 例)で脾臓の黒褐色化が認められた. 不妊例については, 異常は認められなかった.

6.1.5. 器官重量

器官重量の結果を Table 11, 12 及び Appendix 9, 10 に示した.

雄では, 500 mg/kg 群で精巣及び精巣上体の絶対重量及び相対重量に対照群と比較して有意な低値が認められた. なお, 500 mg/kg 群では, 最終体重にも対照群と比較して有意な低値が認められた. 雌では, 20 及び 100 mg/kg 群で対照群との間に有意な差は認められなかった. 500 mg/kg 群では, 検査例数が 2 例であったため, 統計学的評価をすることができなかったが, 最終体重及び卵

巣の絶対重量では対照群と比較して明らかな低値が認められた。なお、卵巢の相対重量では対照群と比較して差は認められなかった。

6.1.6. 病理組織学検査

病理組織学検査の結果を Table 13～18 及び Appendix 11, 12 に示した。なお、文中の括弧内の値は(異常例数/検査例数)である。

生存例では、500 mg/kg 群の雄 8 例(8/8 例)で精巣の軽度ないし中等度の精母細胞及び精子細胞(round 及び elongate)の減少、精巣上体に軽度の管腔内の生殖細胞残渣がみられ、このうち 4 例(4/8 例)で精巣に軽度のセルトリ細胞の空胞化、3 例(3/8 例)で精巣に軽度の精母細胞の変性/壊死、4 例(4/8 例)で精巣上体に軽度の精子の減少が認められ、発現頻度が有意に増加した。更に、500 mg/kg 群の雄 4 例(4/4 例)で腎臓の中等度ないし軽度の好塩基性尿細管、軽度のタンパク円柱及び顆粒円柱がみられ、このうち 3 例(3/4 例)で軽度の近位尿細管上皮細胞の硝子滴が認められた。近位尿細管上皮細胞の硝子滴が認められた例について α_{2u} -グロブリンの免疫染色を実施した結果、陽性(3/3 例)であった。また、500 mg/kg 群の雄 8 例(8/8 例)で脾臓に軽度の赤脾髄のヘモジデリン沈着(ベルリン青染色：陽性、シュモール反応：陽性)がみられ発現頻度が有意に増加した。このうち 3 例(3/8 例)では軽度の髄外造血が認められた。このほか、100 及び 500 mg/kg 群の雄の各 1 例(100 mg/kg 群：1/12 例及び 500 mg/kg 群：1/8 例)で精巣上体の精子肉芽腫がみられたが、いずれも出現例数が少なく、自然発生的に認められる変化であることから、被験物質投与との関連性のない偶発的な変化と考えられた。

死亡例では、500 mg/kg 群の雄 4 例(4/4 例)及び雌 2 例(2/2 例)で腎臓の重度ないし軽度のタンパク円柱及び軽度ないし中等度の好塩基性尿細管がみられ、このうち雄 4 例(4/4 例)及び雌 1 例(1/2 例)で中等度ないし重度の尿細管の壊死が認められた。また、雌 1 例(1/2 例)で軽度の近位尿細管上皮細胞の硝子滴が認められ、 α_{2u} -グロブリンの免疫染色を実施した結果、陰性であった。更に、雄 3 例(3/4 例)及び雌 2 例(2/2 例)で腎臓に軽度の近位尿細管上皮細胞の褐色顆粒の沈着(ベルリン青染色：陰性、シュモール反応：陽性)が認められた。また、雄 1 例(1/4 例)で精巣に軽度の精母細胞の変性/壊死及びセルトリ細胞の空胞化がみられ、雌 1 例(1/1 例)で胸腺の重度の萎縮が認められた。そのほか、雄 1 例(1/1 例)で肺に軽度の肺胞内出血がみられたが、死亡例では認められる変化であり、ほかの死亡例にはみられていないことから、被験物質投与との関連性のない変化と考えられた。

雌の未交尾例、不妊例及び全児死亡例では、500 mg/kg 群の全児死亡例及び未交尾例の各 1 例(各 1/1 例)で、脾臓に軽度の赤脾髄のヘモジデリン沈着(ベルリン青染色：陽性、シュモール反応：陽

性)がみられ、未交尾例では脾臓に軽度の髄外造血も認められた。不妊例に異常は認められなかった。

6.2. 生殖発生毒性

6.2.1. 性周期検査及び生殖能力検査

性周期検査及び生殖能力検査の成績を Table 19 及び Appendix 13, 14 に示した。

性周期検査では、発情回数及び発情周期で対照群と被験物質各投与群との間に有意な差はみられなかったが、500 mg/kg 群の 4 例で性周期の回帰が停止した。

生殖能力検査では、500 mg/kg 群の 1 組を除いてすべてに交尾がみられ、対照群、20 及び 500 mg/kg 群の各 1 組を除いて妊娠が認められた。したがって、交尾率は対照群、20 及び 100 mg/kg 群で雌雄とも 100 %、500 mg/kg 群で雄が 85.71 % 及び雌が 90 %、受胎率は、対照群、20 及び 100 mg/kg 群で雌雄とも 91.67、91.67 及び 100 %、500 mg/kg 群で雄が 100 % 及び雌が 88.89 % であり、対照群と被験物質各投与群との間に有意な差は認められなかった。また、交尾所要日数においても、対照群と被験物質各投与群との間に有意な差は認められなかった。

6.2.2. 分娩及び哺育期(哺育 4 日まで)検査並びに新生児検査

分娩及び哺育期検査の成績を Table 20 及び Appendix 15 に示した。

分娩時の検査では、500 mg/kg 群で対照群と比較して有意な妊娠期間の延長及び分娩状況の不良(出産児の未回集や摂食)がほぼ全例でみられ、対照群と比較して有意な死産率の高値及び出生率の低値が認められた。更に、生後 0 日の雌雄新生児体重では、500 mg/kg 群で対照群と比較して有意な低値が認められた。このほか、新生児の外表検査において 500 mg/kg 群で痕跡尾が 1 例及び耳介開存、短尾、曲尾の合併が 1 例に認められた。出産児数、新生児数、黄体数、着床痕数、着床率、出産率、新生児の性比、外表異常率及び型別外表異常児出現率では、対照群と被験物質各投与群との間に有意な差は認められなかった。

哺育期の検査では、500 mg/kg 群の親動物のほぼ全例で新生児の回集及び授乳行動がみられずに 6 例の親動物で全新生児の死亡がみられ、新生児の生後 4 日の生存率で対照群と比較して有意な低値が認められた。これらの母動物は新生児の回集及び授乳行動を行わず、新生児を摂食する行動が認められた。なお、生後 4 日の雌雄新生児体重では対照群と 20 及び 100 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。500 mg/kg 群では全児死亡例が多発し、統計学的評価を行えなかったが、明らかな低値が認められた。

7. 考察

4.アミノフェノールの安全性に関する毒性試験の一環として、交配前14日間、雄ではその後交配期間を含む35日間、雌では交配期間、妊娠期間及び哺育3日まで経口投与し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

7.1. 反復投与毒性

500 mg/kg 群の雌雄では、雄4例及び雌2例で死亡が認められた。これらの例では、全例で自発運動の低下及び緩徐呼吸がみられ、ほぼ全例で腹臥位及び褐色尿が認められた。更に、1例で、皮膚蒼白、眼球蒼白、体温低下及び横臥位が認められた。皮膚蒼白、眼球蒼白、体温低下及び横臥位は、雌1例のみにみられた変化であるが、本例は著しい一般状態の悪化及び体重減少がみられていることから、被験物質投与に関連した状態悪化に伴う変化と考えられた。生存例では、100及び500 mg/kg 群の雌雄で投与3日の投与後から褐色尿が高頻度にみられ、500 mg/kg 群の雌1例で、投与7日の投与後に自発運動の低下及び緩徐呼吸が認められた。褐色尿については、本被験物質を用いた28日間反復経口投与毒性試験¹⁾の尿検査において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と考えられた。

体重では、500 mg/kg 群の雌雄で投与期間を通して、低値あるいは低値傾向がみられ、摂餌量でも低値が認められた。また、摂餌量の低値は100 mg/kg 群においても認められた。

病理学検査では、腎臓で500 mg/kg 群の死亡例の雄に腎臓の褪色及び肥大、雌に腎臓の黒褐色化が認められた。病理組織学検査では、雌雄で腎臓にタンパク円柱、好塩基性尿細管及び尿細管の壊死が認められた。更に、雌雄で近位尿細管上皮細胞の褐色顆粒の沈着がみられ、ベルリン青染色陰性、シュモール反応陽性を示したことから、消耗性色素と考えられた。生存例では、500 mg/kg 群の雄で腎臓の褪色が認められた。病理組織学検査では、好塩基性尿細管、タンパク円柱及び顆粒円柱が認められた。これらの腎臓の変化に付随して、500 mg/kg 群の死亡例の雌1例で膀胱の赤色尿の貯留が認められた。また、500 mg/kg 群の死亡例の雌及び生存例の雄で、腎臓に近位尿細管上皮細胞の硝子滴がみられ、生存例の雄で α_{2u} -グロブリンの存在が確認された。この変化は糸球体より濾過された蛋白の再吸収像と考えられ、死亡例の雌に α_{2u} -グロブリンの存在が認められなかったことから、雄ラット固有の蛋白である α_{2u} -グロブリンが関与した変化、すなわち雄ラット固有の変化と考えられた²⁾。なお、死亡例の雌については、生存例の雌では同様な変化は認められておらず、1例のみの変化であることから、被験物質投与との関連性は低いと考えられた。

脾臓では、500 mg/kg 群の生存例の雄、未交尾例の雌及び全児死亡例の雌で脾臓の黒褐色化が認

められた。病理組織学検査では、500 mg/kg 群の生存例の雄、未交尾例の雌及び全児死亡例の雌で脾臓に赤脾髄のヘモジデリン沈着がみられ、生存例の雄では、発現頻度の増加が認められた。更に、生存例の雄及び未交尾例の雌では、脾臓に髄外造血が認められた。本変化は、先に実施された28日間反復経口毒性試験¹⁾において、本被験物質投与による溶血の可能性が示唆されていることから、同様の変化と考えられた。

精巣及び精巣上体では、500 mg/kg 群の死亡例の雄1例に病理組織学検査で精巣の精母細胞の変性/壊死及びセルトリ細胞の空胞化が認められた。生存例では、500 mg/kg 群の雄1例で精巣の小型化がみられ、器官重量においても、雄の500 mg/kg 群で精巣及び精巣上体の絶対重量及び相対重量に低値が認められた。病理組織学検査では、500 mg/kg 群の雄で精巣の精母細胞及び精子細胞の減少、精母細胞の変性/壊死及びセルトリ細胞の空胞化がみられ、精巣上体で管腔内の生殖細胞残渣及び精子の減少が認められた。これらの変化は高用量群のみでみられ、発現頻度の増加も認められていることから、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

そのほか、500 mg/kg 群の死亡例の雌1例で胸腺の小型化がみられ、病理組織学検査では、胸腺の萎縮が認められた。本例は、著しい一般状態の悪化及び体重減少が認められていることから、被験物質投与による状態悪化に伴う変化と考えられた。また、500 mg/kg 群の死亡例の雌雄各1例で胸水及び腹水の貯留並びに胸水の貯留が認められた。これらの例では、腎臓の褪色、黒褐色化及び肥大がみられ、腎機能低下による循環障害が生じている可能性が示唆されたが、水腫性変化は、生存例には認められず、絶食や低栄養によっても生じることから、腎臓の変化に付随して生じたものとは考え難かった。

以上のように、雌雄とも500 mg/kg 群で死亡の発生がみられ、生存例においても100及び500 mg/kg 群で一般状態、体重及び摂餌量、500 mg/kg 群で病理学検査に被験物質投与による影響が認められていることから、本試験条件下における4-アミノフェノールの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄とも20 mg/kg/dayと推察された。

7.2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、平均発情回数及び平均発情周期に変化はみられなかったが、500 mg/kg 群の4例で性周期の回帰が停止した。また、500 mg/kg 群では、妊娠期間が延長し、分娩及び哺育行動の不良がほぼ全例で認められた。交尾所要日数、交尾率、受胎率、黄体数、着床痕数、着床率及び出産率では、被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時及び哺育期検査では、500 mg/kg 群で死産率の高値、出生率の低値及び新生児の生後4

日の生存率に低値が認められた。これらの生存性の低下については、親動物の分娩及び哺育行動の不良に伴う変化と考えられた。更に、500 mg/kg 群では生後 0 及び 4 日の雌雄新生児体重で低値が認められた。新生児の外表検査では、500 mg/kg 群で 2 例の外表異常(痕跡尾が 1 例及び耳介開存、短尾、曲尾の合併が 1 例)がみられたが、被験物質各投与群で外表異常率及び型別外表異常児出現率に変化はみられず、出現例数も少ないことから自然発生的な変化と考えられた。なお、出産児数、新生児数及び新生児の性比には被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のように、親動物の生殖機能に対する影響として、500 mg/kg 群で性周期の停止、妊娠期間の延長、分娩及び哺育行動の不良が認められた。次世代児に及ぼす被験物質投与の影響として、500 mg/kg 群で死産率の高値、出生率の低値、新生児体重の低値及び生後 4 日の生存率の低値が認められた。したがって、本試験条件下における親動物の生殖能力及びに次世代児に関する無影響量は、親動物及び児動物ともに 100 mg/kg/day と推察された。

参考文献

- 1) 4-アミノフェノールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験
化学物質毒性試験報告, Vol.5, 447-462
- 2) K. N. M. Khan, C.L. Alden, (1991): 33 Kidney.Ⅳ Mechanisms of injury C. Proximal Tubular Injury In, Handbook of Toxicologic Pathology," eds. by W. M. Haschek, C.G. Rousseaux, Academic Press, San Diego, pp.285-301.

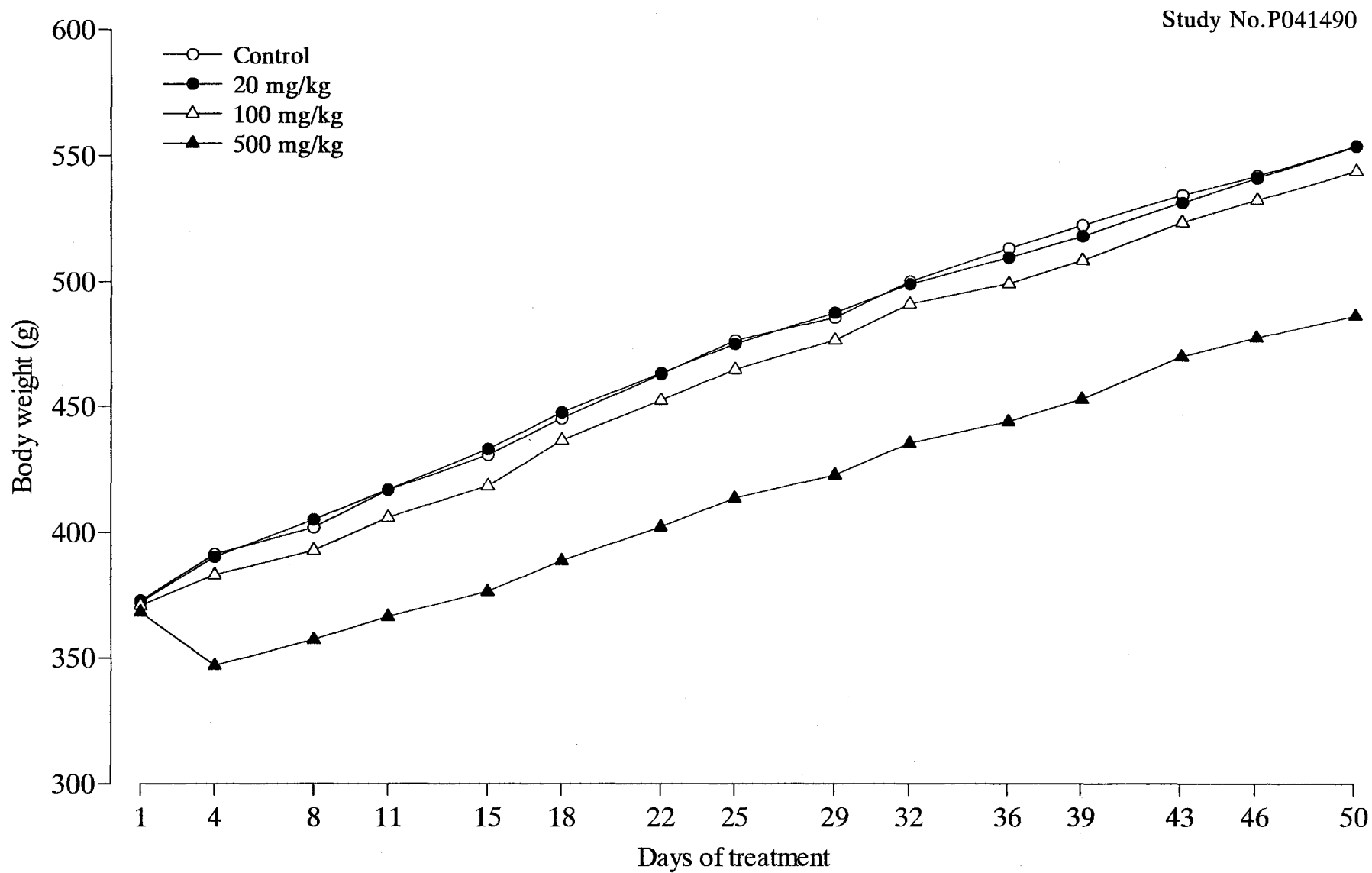


Fig.1 Mean body weight changes of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

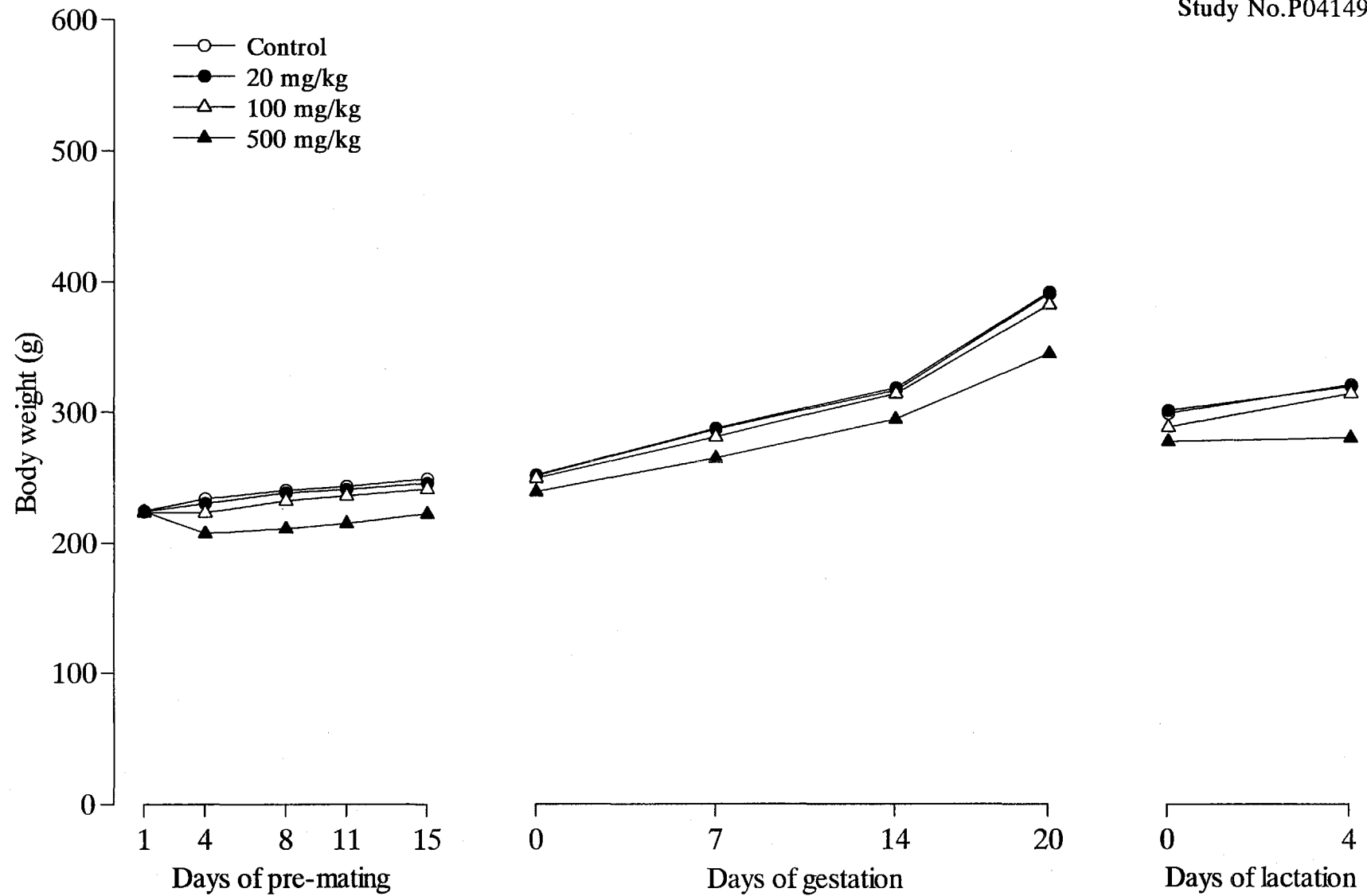


Fig.2 Mean body weight changes of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Study No.P041490

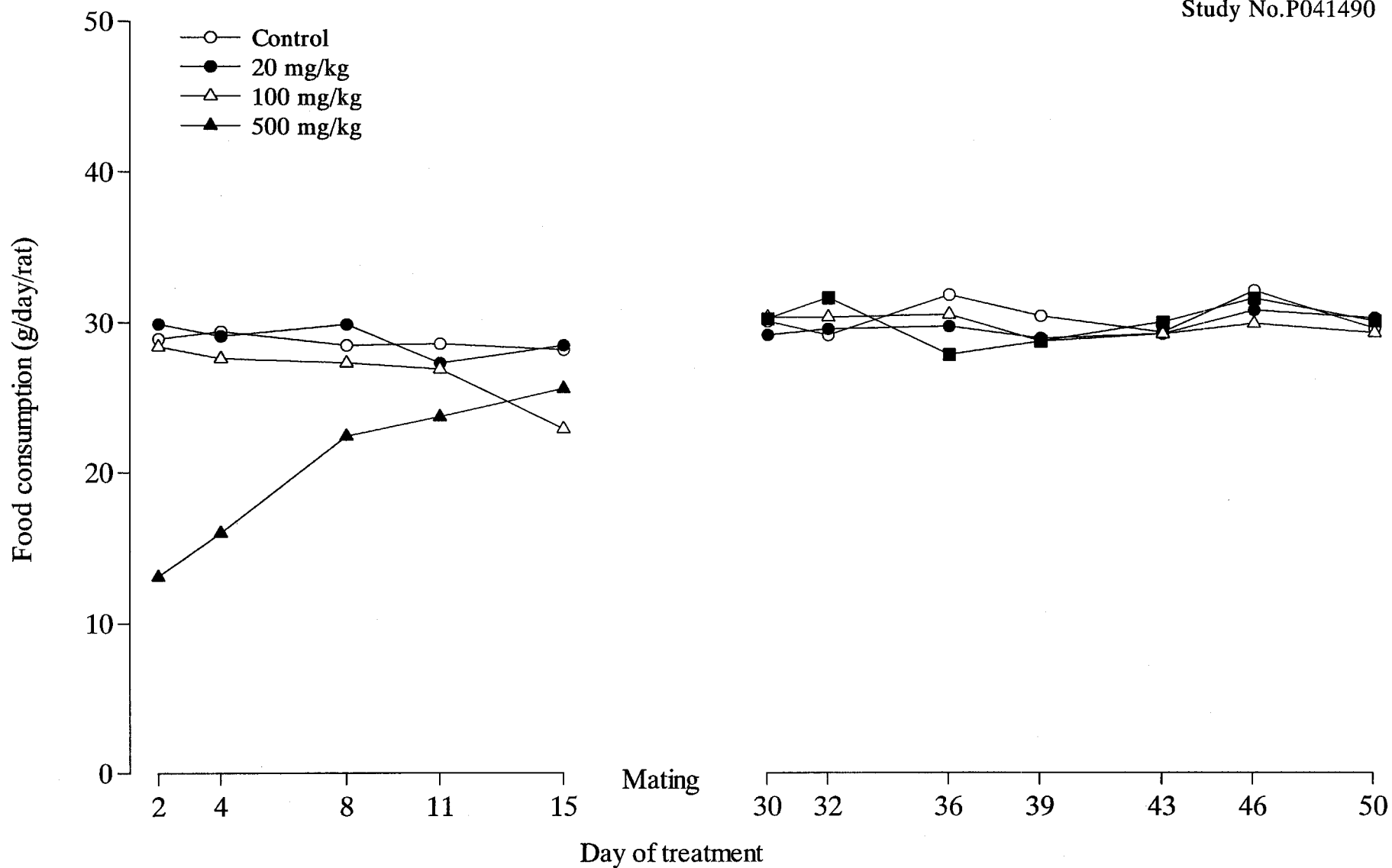


Fig.3 Mean food consumption of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

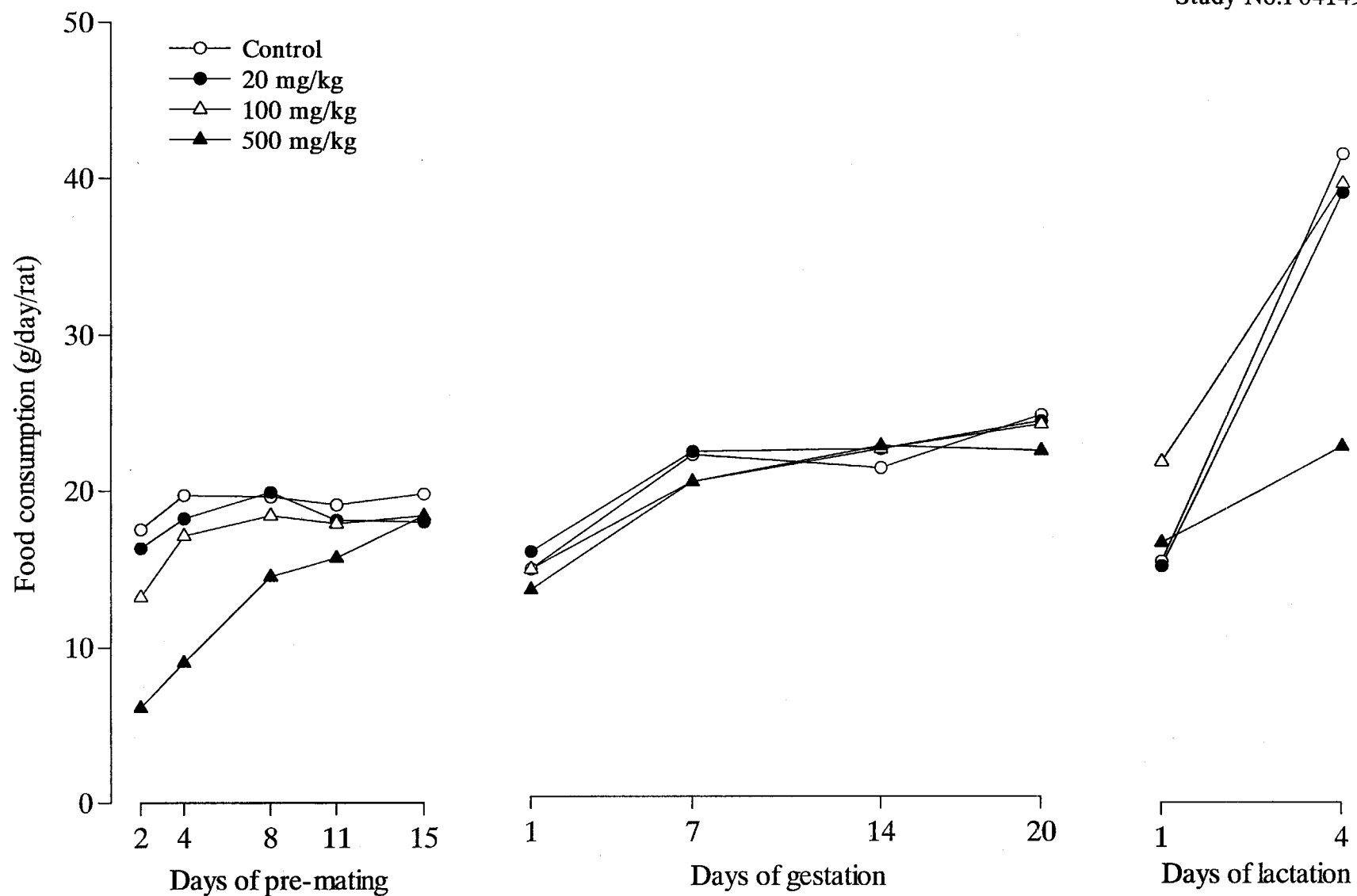


Fig.4 Mean food consumption of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Table 1 Clinical signs of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	7	3	3	0	1	2	5	7	4	6	3
	Brown urine	0	0	5	9	9	12	11	10	7	5	8	6	9
500 mg/kg	Number of examined	12	12	12	10	9	8	8	8	8	8	8	8	8
	No abnormality	12	12	6	4	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	Brown urine	0	0	2	6	8	8	8	8	8	8	8	7	7
	Prone position	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease in locomotor activity	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	Dead	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1 - continued Clinical signs of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment													
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	9	4	11	5	4	5	3	0	2	0	2	3	2	1
	Brown urine	3	8	1	7	8	7	9	12	10	12	10	9	10	11
500 mg/kg	Number of examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	No abnormality	1	0	3	2	0	1	1	0	0	1	0	2	0	0
	Brown urine	7	8	3	5	6	4	4	4	6	6	7	6	8	8
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	3	3	2	4	5	5	6	5	5	4	3	2	5	4
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1 - continued Clinical signs of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment													
		28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	2	2	1	1	1	1	2	5	4	5	0	0	2	0
	Brown urine	10	10	11	11	11	11	10	7	8	7	12	12	10	12
500 mg/kg	Number of examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	No abnormality	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Brown urine	6	6	7	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	5	5	4	4	0	0	2	2	4	2	2	1	3	4
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1 - continued Clinical signs of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment								
		42	43	44	45	46	47	48	49	50
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	Brown urine	12	12	12	12	12	12	12	11	12
500 mg/kg	Number of examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Brown urine	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	4	5	4	4	4	3	2	4	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 Clinical signs of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	5	6	5	1	1	1	1	3	0	3	1
	Brown urine	0	0	7	6	7	11	11	11	11	9	12	9	11
500 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	No abnormality	12	12	12	3	3	1	0	2	1	0	3	1	1
	Brown urine	0	0	0	9	8	10	11	9	10	11	8	10	10
	Decrease in locomotor activity	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1
	Bradypnea	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1
	Dead	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
	Loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lateral position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment														
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
Control	Number of examined	12	12	12	9	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	No abnormality	12	12	12	9	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	9	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	
	No abnormality	12	12	12	9	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	7	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
	No abnormality	4	2	10	6	3	2	0	1	1	1	0	0	0	0	
	Brown urine	8	10	2	1	2	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
500 mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	9	8	6	6	5	4	3	3	2	2	
	No abnormality	5	1	5	2	1	2	1	3	1	1	0	1	0	0	
	Brown urine	5	10	4	7	7	4	3	1	2	1	2	1	2	2	
	Decrease in locomotor activity	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	Bradypnea	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	Pale skin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	Pale eyes	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	Salivation	1	2	2	3	3	3	2	1	2	2	0	0	2	2	
	Loss of hair	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	Lateral position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment													
		28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
Control	Number of examined	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 mg/kg	Number of examined	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 mg/kg	Number of examined	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500 mg/kg	Number of examined	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
	No abnormality	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Brown urine	0	0	2	2	2	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	2	2	1	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	Loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lateral position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment								
		42	43	44	45	46	47	48	49	50
Control	Number of examined	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 mg/kg	Number of examined	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 mg/kg	Number of examined	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500 mg/kg	Number of examined	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Brown urine	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pale skin	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pale eyes	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lateral position	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of gestation													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
500 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	No abnormality	5	8	8	5	7	7	7	8	7	7	8	8	8	9
	Salivation	4	1	0	3	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0
	Loss of hair	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0

One animal(500 mg/kg) did not copulated.

Three animals(Control:1, 20 mg/kg:1 and 500 mg/kg:1) were non-pregnant.

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of gestation										
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	1
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	1
20 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	1
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	1
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	1
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	1
500 mg/kg	Number of examined	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	3
	No abnormality	9	8	8	7	8	7	8	9	8	8	3
	Salivation	0	1	1	2	1	2	1	0	1	1	0
	Loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

One animal (500 mg/kg) did not copulated.

Three animals (Control:1, 20 mg/kg:1 and 500 mg/kg:1) were non-pregnant.

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of lactation				
		0	1	2	3	4
Control	Number of examined	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11
20 mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12
500 mg/kg	Number of examined	8	8	7	5	3
	No abnormality	4	6	5	4	3
	Salivation	4	2	2	1	0

All newborns from 6 animals (500 mg/kg) died from days 1 to 4 of lactation.

Table 3 Body weights of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control		20 mg/kg		100 mg/kg		500 mg/kg					
		Body weight (g)											
Days of treatment	1	372.8±	17.6	(12)	372.2±	20.1	(12)	370.9±	18.5	(12)	368.3±	18.4	(12)
	4	391.3±	15.9	(12)	390.3±	23.0	(12)	383.0±	26.1	(12)	347.0±	31.1**	(9)
	8	402.1±	16.0	(12)	405.2±	25.7	(12)	392.9±	29.6	(12)	357.2±	24.6**	(8)
	11	417.0±	19.6	(12)	417.2±	27.7	(12)	406.1±	31.4	(12)	366.5±	26.1**	(8)
	15	431.0±	20.9	(12)	433.3±	30.6	(12)	418.8±	36.4	(12)	376.5±	27.8**	(8)
	18	445.5±	23.9	(12)	447.8±	31.8	(12)	436.8±	38.6	(12)	388.9±	29.3**	(8)
	22	463.1±	23.0	(12)	463.6±	34.0	(12)	452.7±	41.4	(12)	402.5±	31.9**	(8)
	25	476.7±	23.1	(12)	475.3±	35.3	(12)	465.1±	43.0	(12)	413.9±	35.3**	(8)
	29	486.0±	23.4	(12)	488.0±	36.6	(12)	476.9±	47.2	(12)	423.3±	37.5**	(8)
	32	500.7±	25.2	(12)	499.6±	37.6	(12)	491.6±	48.4	(12)	435.8±	37.7**	(8)
	36	514.0±	28.8	(12)	510.3±	37.2	(12)	499.9±	48.6	(12)	444.5±	39.5**	(8)
	39	523.2±	25.0	(12)	518.9±	37.7	(12)	509.3±	49.7	(12)	453.5±	40.5**	(8)
	43	535.3±	26.7	(12)	532.3±	38.8	(12)	524.4±	50.2	(12)	470.6±	45.2**	(8)
	46	543.0±	29.9	(12)	542.2±	36.9	(12)	533.4±	50.8	(12)	478.2±	46.6**	(8)
	50	555.0±	31.7	(12)	554.8±	39.4	(12)	545.0±	51.7	(12)	487.2±	49.1**	(8)

** : P<0.01 (significantly different from control).
 Values are mean±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.
 Four animals(500 mg/kg) died from days 3 to 5 of treatment.

Table 4 Body weights of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control			20 mg/kg			100 mg/kg			500 mg/kg		
		Body weight (g)											
Days of treatment	1	224.5±	13.4	(12)	224.0±	12.1	(12)	223.4±	7.6	(12)	224.2±	9.3	(12)
	4	233.7±	15.0	(12)	230.2±	11.9	(12)	223.2±	7.9	(12)	207.4±	13.0**	(12)
	8	240.4±	17.5	(12)	238.3±	13.9	(12)	232.3±	6.2	(12)	211.1±	13.3**	(11)
	11	243.2±	17.3	(12)	241.0±	14.0	(12)	236.1±	6.7	(12)	215.1±	13.3**	(11)
	15	248.9±	18.8	(12)	245.6±	13.6	(12)	241.1±	9.3	(12)	222.3±	16.6**	(11)

** : P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal (500 mg/kg) died on day 4 of treatment.

Table 4 - continued Body weights of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control			20 mg/kg			100 mg/kg			500 mg/kg		
		Body weight (g)											
Days of gestation	0	251.4±	19.0	(11)	252.1±	14.0	(11)	249.6±	13.7	(12)	239.4±	14.1	(8)
	7	287.1±	22.7	(11)	287.8±	20.3	(11)	281.3±	10.6	(12)	265.2±	16.4*	(8)
	14	317.1±	23.4	(11)	319.1±	24.8	(11)	314.5±	12.8	(12)	295.0±	17.5	(8)
	20	391.5±	29.4	(11)	393.0±	36.2	(11)	383.1±	20.9	(12)	345.4±	17.5**	(8)
Days of lactation	0	299.7±	27.3	(11)	301.8±	22.1	(11)	289.2±	17.2	(12)	278.3±	13.9	(8)
	4	322.2±	27.2	(11)	320.8±	22.3	(11)	315.3±	14.5	(12)	281.5±	-	(2)

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal(500 mg/kg) did not copulated.

Three animals(Control:1, 20 mg/kg:1 and 500 mg/kg:1) were non-pregnant.

All newborns from 6 animals(500 mg/kg) died from day 1 to 4 of lactation.

Table 5 Food consumption of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control			20 mg/kg			100 mg/kg			500 mg/kg		
Days of treatment		Food consumption (g/day/rat)											
	2	28.9±	2.8	(12)	29.9±	2.5	(12)	28.4±	4.1	(12)	13.1±	7.2**	(12)
	4	29.4±	2.5	(12)	29.1±	2.7	(12)	27.6±	4.0	(12)	16.0±	7.0**	(9)
	8	28.5±	3.5	(12)	29.9±	3.1	(12)	27.3±	5.0	(12)	22.4±	2.9**	(8)
	11	28.6±	2.0	(12)	27.3±	2.9	(12)	26.9±	2.9	(12)	23.7±	2.2**	(8)
	15	28.2±	2.4	(12)	28.5±	2.8	(12)	22.9±	8.8	(12)	25.6±	3.0	(8)
	30	30.1±	2.6	(12)	29.2±	2.8	(12)	30.4±	3.7	(12)	30.3±	2.9	(7) a)
	32	29.2±	2.6	(12)	29.6±	3.4	(12)	30.4±	3.1	(12)	31.7±	3.6	(7) a)
	36	31.9±	3.6	(12)	29.8±	2.4	(12)	30.6±	4.0	(12)	27.9±	5.4	(8)
	39	30.5±	3.0	(12)	29.0±	3.4	(12)	28.8±	4.5	(12)	28.8±	4.2	(8)
	43	29.4±	1.5	(12)	29.3±	3.1	(12)	29.3±	3.8	(12)	30.1±	4.0	(8)
	46	32.2±	4.3	(12)	30.9±	2.1	(12)	30.0±	3.1	(12)	31.7±	3.4	(8)
	50	29.7±	3.0	(12)	30.4±	3.9	(12)	29.4±	3.4	(12)	30.2±	4.6	(8)

** : P<0.01 (significantly different from control).
 Values are mean±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.
 Four animals(500 mg/kg) died from days 3 to 5 of treatment.
 a) No measurement of one animal(500 mg/kg) during the mating period.

Table 6 Food consumption of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control			20 mg/kg			100 mg/kg			500 mg/kg		
		Food consumption (g/day/rat)											
Days of treatment	2	17.5±	2.4	(12)	16.3±	2.0	(12)	13.2±	2.7**	(12)	6.1±	5.1**	(12)
	4	19.7±	2.8	(12)	18.2±	2.2	(12)	17.1±	1.9*	(12)	9.0±	5.5**	(12)
	8	19.6±	5.1	(12)	19.9±	3.3	(12)	18.4±	1.8*	(12)	14.5±	3.1**	(11)
	11	19.1±	3.0	(12)	18.1±	2.2	(12)	17.9±	2.1	(12)	15.7±	3.9*	(11)
	15	19.8±	2.9	(12)	18.0±	2.9	(12)	18.4±	2.3	(12)	18.4±	4.5	(11)

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal (500 mg/kg) died on day 4 of treatment.

Table 6 - continued Food consumption of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control			20 mg/kg			100 mg/kg			500 mg/kg		
		Food consumption (g/day/rat)											
Days of gestation	1	15.0±	2.8	(11)	16.1±	2.0	(11)	15.0±	2.2	(12)	13.7±	3.8	(8)
	7	22.3±	3.0	(11)	22.5±	2.9	(11)	20.6±	2.1	(12)	20.6±	3.5	(8)
	14	21.5±	2.5	(11)	22.7±	2.6	(11)	22.7±	1.7	(12)	22.9±	2.5	(8)
	20	24.9±	2.7	(11)	24.5±	3.1	(11)	24.3±	2.4	(12)	22.6±	2.8	(8)
Days of lactation	1	15.5±	8.6	(11)	15.2±	8.4	(11)	21.9±	5.5	(12)	16.7±	3.3	(7)
	4	41.7±	7.5	(11)	39.2±	6.3	(11)	39.8±	6.3	(12)	22.9±	-	(2)

Not significantly different from control.

Values are mean±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal(500 mg/kg) did not copulated.

Three animals(Control:1, 20 mg/kg:1 and 500 mg/kg:1) were non-pregnant.

All newborns from 6 animals(500 mg/kg) died from days 1 to 4 of lactation.

Table 7 Necropsy findings of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings	Sex	Male			
	Group and dose	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
	Number of animals	12	12	12	8
Digestive system					
Liver					
Hernia, diaphragmatic		1	0	0	0
Hematopoietic system					
Spleen					
Coloration, black-brown		0	0	0	8
Urinary system					
Kidney					
Discoloration, bilateral		0	0	0	4
Genital system					
Testis					
Small, bilateral		0	0	0	1
Epididymis					
Nodule, unilateral, light yellow		0	1	0	1

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 8 Necropsy findings of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test
-Dead

Organs and findings	Group and dose	500 mg/kg			
		Animal No.	137	144	145 147
Respiratory system					
Lung					
Spot, dark red			-	-	- +
Urinary system					
Kidney					
Discoloration, bilateral			+	+	+
Enlargement, bilateral			+	+	+
Others					
Thoracic cavity					
Hydrothorax			-	-	- +
Abdominal cavity					
Ascites			-	-	- +

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.
No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 9 Necropsy findings of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings	Sex	Female			
	Group and dose	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
	Number of animals	11	11	12	2
All organs and tissues		NR	NR	NR	NR

NR: no remarkable changes.

Table 10 Necropsy findings of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test
-Unscheduled sacrifice

Organs and findings	Group and dose	Control	20 mg/kg	500 mg/kg									
	Animal No.	154	164	187	188	189	190	191	192	194	196	197	198
Hematopoietic system													
Thymus													
Small		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen													
Coloration, black-brown		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Urinary system													
Kidney													
Coloration, black-brown		-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Urinary bladder													
Retention, urine, reddish		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Integumentary system													
Integument													
Loss, hair		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Others													
Thoracic cavity													
Hydrothorax		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

No appreciable changes in all other organs and tissues.

No. 154, 164 and 189: non-pregnant female.

No. 187 and 191: dead females.

No. 188, 190, 192, 194, 196 and 197: dams that all newborn died.

No. 198: Uncopulating female.

Table 11 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals	12	12	12	8
Absolute organ weights				
Final body weight (g)	555.0±31.7	554.8±39.4	545.0±51.7	487.2±49.1**
Epididymides (g)	1.27±0.07	1.27±0.08	1.23±0.09	0.92±0.05**
Testes (g)	3.53±0.14	3.50±0.33	3.34±0.24	2.40±0.29**
Relative organ weights				
Epididymides (g/100 gB.W.)	0.23±0.02	0.23±0.01	0.23±0.02	0.19±0.02**
Testes (g/100 gB.W.)	0.64±0.05	0.63±0.04	0.62±0.05	0.49±0.05**

** : P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D.

Table 12 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals	11	11	12	2
Absolute organ weights				
Final body weight (g)	322.2±27.2	320.8±22.3	315.3±14.5	281.5±-
Ovaries (mg)	90.7±9.9	95.8±11.0	96.7±8.2	81.7±-
Relative organ weights				
Ovaries (mg/100 gB.W.)	28.1±1.4	29.9±3.1	30.7±2.9	29.2±-

Not significantly different from control.
Values are mean±S.D.

Table 13 Histopathological findings of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings	Sex Group and dose Number of animals	Male														
		Control					20 mg/kg					100 mg/kg				
		12					12					12				
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Digestive system																
Liver						NR(1)					(0)					(0)
Hematopoietic system											(0)					(0)
Spleen						(1)					(0)					(8)
Hematopoiesis, extramedullary		1	0	0	0	0									5	3
Deposit, hemosiderin, red pulp		1	0	0	0	0									0	8
Urinary system											(0)					(4)
Kidney						(1)					(0)					(4)
Tubule, basophilic		1	0	0	0	0									0	1
Droplet, epithelial cell, proximal tubule, hyaline		1	0	0	0	0									1	3
Cast, granular		1	0	0	0	0									0	4
Cast, proteinaceous		1	0	0	0	0									0	4
Genital system																
Testis						(12)					(1)					(12)
Decrease, spermatocyte		12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Decrease, spermatid (round)		12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Decrease, spermatid (elongate)		12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Vacuolation, Sertoli cell		12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Degeneration/necrosis, spermatocyte		12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Epididymis						(12)					(1)					(12)
Decrease, sperm, lumen		12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Debris, germ cell, lumen		12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Granuloma, spermatid		12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	11	1	0	0	1

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 14 Histopathological findings of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test - Dead

Organs and findings	Group and dose Animal No.	500 mg/kg			
		137	144	145	147
Respiratory system					
Lung		*	*	*	
Hemorrhage, alveolus					+
Urinary system					
Kidney					
Necrosis, tubule		+++	++	++	++
Tubule, basophilic		+	+	+	+
Deposit, epithelial cell, proximal tubule, granular, brown		-	+	+	+
Cast, proteinaceous		+++	+++	+++	+++
Genital system					
Testis					
Vacuolation, Sertoli cell		-	-	+	-
Degeneration/necrosis, spermatocyte		-	-	+	-
Epididymis		NR	NR	NR	NR

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

*: not examined.

Table 15 Histopathological findings of male rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test
 - Immunohistochemistry for α 2u-globulin

Organs and findings	Group and dose	500 mg/kg		
	Animal No.	141	142	148
Urinary system				
Kidney				
Droplet, epithelial cell, proximal tubule, hyaline + + +				

Grade sign : -, negative; +, positive.

Table 16 Histopathological findings of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings	Sex	Female														
	Group and dose	Control					20 mg/kg					100 mg/kg				
	Number of animals	11					11					12				
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Hematopoietic system																
Spleen						NR(1)					(0)					(0)
Genital system																
Ovary						NR(11)					(0)					NR(2)

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 17 Histopathological findings of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test
- Unscheduled sacrifice

Organs and findings	Group and dose Animal No.	Control	20 mg/kg		500 mg/kg								
		154	164	187	188	189	190	191	192	194	196	197	198
Hematopoietic system													
Thymus		*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Atrophy				+++									
Spleen		*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	
Hematopoiesis, extramedullary											-		+
Deposit, hemosiderin, red pulp											+		+
Urinary system													
Kidney		*	*		*	*	*		*	*	*	*	*
Necrosis, tubule				-				++					
Tubule, basophilic				++				+					
Droplet, epithelial cell, proximal tubule, hyaline				+				-					
Deposit, epithelial cell, proximal tubule, granular, brown				+				+					
Cast, proteinaceous				+				+++					
Genital system													
Ovary		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Integumentary system													
Integument		*	*	NR	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

NR: no remarkable changes.

*: not examined.

No.154,164 and 189: non-pregnant female.

No.187 and 191: dead females.

No.188,190,192,194,196 and 197: dams that all newborn died.

No.198: Uncooperating female.

Table 18 Histopathological findings of female rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test
- Immunohistochemistry for α 2u-globulin

Organs and findings	Group and dose	500 mg/kg
		187
Urinary system		
Kidney		
Droplet, epithelial cell, proximal tubule, hyaline		-

Grade sign : -, negative; +, positive.

Table 19 Reproductive performance of rats treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
No. of females examined	12	12	12	11
Count of estrus ^{a)}	3.75± 0.45	3.83± 0.58	3.92± 0.90	2.64± 1.57
Estrous cycle ^{b)}	4.00± 0.00	3.94± 0.19	4.00± 0.00	4.14± 0.38
No. of mated				
Male	12	12	12	7
Female	12	12	12	10
No. of copulated ^{c)}				
Male	12(100)	12(100)	12(100)	6(85.71)
Female	12(100)	12(100)	12(100)	9(90.00)
No. of impregnated ^{d)}	11(91.67)	11(91.67)	12(100)	6(100)
No. of pregnant ^{d)}	11(91.67)	11(91.67)	12(100)	8(88.89)
Duration of mating ^{b)}	2.50± 1.17	2.58± 1.24	2.92± 3.34	4.56± 4.03

Not significantly different from control.

a) Values are mean±S.D.

b) Values are mean±S.D. (day)

c) Values in parentheses represent percentages to the number of mated.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of copulated.

Table 20 Terminal delivery of Fo dams treated orally with 4-aminophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
No. of dams	11	11	12	8
No. of dams with live newborns	11	11	12	8
Gestation index ^{c)}	100	100	100	100
Gestational days ^{a)}	22.18 ± 0.40	22.18 ± 0.40	22.58 ± 0.67	23.25 ± 0.46**
No. of corpora lutea ^{a)}	15.36 ± 1.57	14.09 ± 2.02	15.25 ± 1.82	15.63 ± 1.51
No. of implantations ^{a)}	14.36 ± 1.03	13.64 ± 1.96	14.17 ± 2.82	14.75 ± 0.89
Implantation index ^{b)}	93.49	96.77	92.90	94.40
No. of newborns ^{a)}	12.82 ± 3.12	13.00 ± 1.95	13.33 ± 2.84	11.13 ± 3.52
No. of stillborns ^{d)}				
Male	1	0	3	6
Female	0	1	0	2
Total	1 (0.71)	1 (0.70)	3 (1.88)	8 (8.99)*
No. of live newborns ^{a)}	12.73 ± 3.20	12.91 ± 1.97	13.08 ± 2.57	10.13 ± 4.39
Birth index ^{e)}	88.61	94.67	92.35	68.64*
Sex ratio of live newborns ^{f)}	1.12 (74/ 66)	0.87 (66/ 76)	0.78 (69/ 88)	1.61 (50/ 31)
Body weight of live newborns (g) ^{a)}				
Male on day 0	6.9 ± 0.6	6.9 ± 0.3	6.7 ± 0.9	4.9 ± 0.6**
on day 4	10.9 ± 1.6	11.0 ± 0.9	10.7 ± 2.2	6.1 ± -
Female on day 0	6.5 ± 0.7	6.5 ± 0.4	6.4 ± 0.8	4.5 ± 0.6**
on day 4	10.4 ± 1.6	10.5 ± 0.9	10.2 ± 2.0	6.9 ± -
Viability index ^{g)}	99.29	99.30	98.73	24.69**
No. of external anomalies ^{h)}	0	0	0	2(2.47)
Open auricle	0	0	0	1(1.23)
Vestigial tail	0	0	0	1(1.23)
Short tail	0	0	0	1(1.23)
Kinky tail	0	0	0	1(1.23)

*: <0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

a) Values are mean ± S.D.

b) Implantation index = (Number of implantations/Number of corpora lutea) × 100.

c) Gestation index = (Number of dams with live newborns/Number of pregnant females) × 100.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of litter.

e) Birth index = (Number of live newborns/Number of implantations) × 100.

f) Values in parentheses represent the number of male/female live newborns.

g) Viability index = (Number of live newborns on day 4 after birth/Number of live newborns) × 100.

h) Values in parentheses represent percentages to the number of live newborns.