

3-メチル-4-ニトロフェノールのラット
における簡易生殖毒性試験報告書

株式会社化合物安全性研究所

目 次

	頁
表題・試験番号	
要 約 -----	3
緒 言 -----	4
材料及び方法 -----	4
成 績 -----	11
考 察 -----	13
参 考 文 献 -----	17
Figures and tables -----	別添

表 題 3-メチル-4-ニトロフェノールのラットにおける簡易生殖毒性試験

試験番号 SR-9234

要 約

3-メチル-4-ニトロフェノール (CAS No.2581342) の 30、100及び 300mg/kg/day を雄ラットの交配前及び交配期間を含む46日間、雌ラットの交配前、交配及び妊娠期間、哺育3日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖及び次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験し、以下の知見が得られた。

1. 雌雄動物の反復投与毒性

- (1)300mg/kg群の雄1例で死亡が投与1日の投与後に認められた。本例では、死亡前に自発運動の減少、腹臥及び呼吸緩徐が認められ、病理組織学的検査では腎臓、心臓及び肺に血栓形成が認められた。前述の症状は 300mg/kg 群の雌2例で妊娠 20あるいは 21日に認められた。また、死亡例を除く 30mg/kg以上の群の雌雄全例で投与期間中に黄色尿が認められたが、被験物質が淡黄褐色を呈していることに起因するものと考えられた。
- (2)体重推移、摂餌量及び剖検では、3-メチル-4-ニトロフェノール投与による影響は認められなかった。
- (3)以上より、3-メチル-4-ニトロフェノール 投与による毒性は 300mg/kg群において死亡が雄1例に認められたこと、自発運動の減少、腹臥及び呼吸緩徐が死亡例及び雌2例に認められたことであった。これらのことから、本スクリーニング試験における3-メチル-4-ニトロフェノール反復投与による無影響量 (NOEL) は雌雄ともに 100mg/kg/dayであることが示唆された。

2. 雌雄動物の生殖毒性及び次世代の発生毒性

- (1)生殖能検査、生殖器の重量及び病理組織学的検査、分娩及び母性行動観察、新生児の生存性、一般状態観察、体重推移及び剖検では、3-メチル-4-ニトロフェノール投与による影響は認められなかった。
- (2)以上より、3-メチル-4-ニトロフェノールの生殖発生に対する影響は認められないことから、本スクリーニング試験における 3-メチル-4-ニトロフェノール の雌雄動物の生殖及び次世代の発生に対する無影響量は 300mg/kg/day であることが示唆された。

結 言

3-メチル-4-クロロフェノール (CAS No.2581342) を雄ラットの交配前及び交配期間を含む46日間、雌ラットの交配前、交配及び妊娠期間、哺育3日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖及び次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験したので、その成績を報告する。

なお、本試験は「OECD優良試験所指針C (81) 30最終別添2」に従い、試験方法はOECDテストガイドライン及び OECD 提案ガイドライン (Preliminary Reproduction Toxicity Screening test) に準拠した。

材料及び方法

1. 被験物質

被験物質は、より提供された 3-メチル-4-クロロフェノール (CAS No.2581342、以下、MNP と称す。Lot番号： 純度：98.5%) である。被験物質は、特有の臭気を有する水に溶けにくい淡黄褐色の結晶であり、密閉容器に入れ、直射日光を避け、冷所 (2～8℃) で乾燥した通気性のよい場所に保存した (1992年10月5日受領書類)。

2. 試験動物

生後8週齢の Crj: CD (SD) 系 SPFラット (雄: 55匹、体重範囲 219～248g, 雌: 55匹、体重範囲 149～180g) を 1992年9月30日に日本チャールス・リバー株式会社より受け入れ、18日間の馴化飼育を行った。馴化期間中、一般状態観察を1日1回、体重測定を期間中4回実施し、順調な発育を示した動物を試験に用いた。なお、雌については、期間中、性周期検査を行い、性周期に異常の認められない動物を用いた。

3. 飼育環境条件

動物の飼育は、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数10～15回/時間、照明時間12時間 (午前8時から午後8時まで点灯) に設定されたバリアシステムの飼育室 (133号室) において、ブラケット式金属製金網床ケージ (260W×380D×180H, mm) を用いて行った。ただし、妊娠17日より金属網床のかわりに実験動物用床敷 (ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社) を敷いたステンレス製受皿を使用した。ケージ当た

りの収容匹数は、群分け前は3匹以内、群分け後は1匹、交配中は雌雄各1匹、妊娠期間中は1母動物、哺育期間中は1腹とした。ケージの交換は2週に1回の頻度で行った。

飼育室内の清掃及び床の清拭消毒は1日1回の頻度で行った。なお、消毒には塩素系消毒薬（ヤクラックス、ヤクハン製薬株式会社）及びヨウ素系消毒薬（ダイヤゼン、旭硝子株式会社）を1週間単位で交互に使用した。

飼料は固型飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）を金属製給餌器を用いて、飲料水は水道水（札幌市水道水）を自動給水装置を用いて、それぞれ自由に摂取させた。給餌器の交換は2週に1回、自動給水装置の水抜きは週1回の頻度で行った。

飼料の分析及び検査は財団法人日本食品分析センターで実施（分析試験成績書：第 45080201-001、45091070-001、45100258-001及び 45110169-001号）し、各混入物質について当社 SOPの許容範囲内であることを確認した。飲料水の水質検査は株式会社福田水文センターで実施（水質検査結果書：第 04512及び 04517号）し、当社 SOPの水質基準の範囲内であることを確認した。

4. 試験群の設定、群分け及び個体識別

試験群は、p-ニトロメタクレゾール（CAS No.2581342）のラットにおける急性毒性試験¹⁾の結果を参考に設定した。すなわち、経口投与によるLD₅₀値は雄で 2300mg/kg、雌で 1200mg/kgであり、1000mg/kg 群では雄 1/5例、雌 2/5例に死亡が認められた。また、500mg/kg群では雄に異常は認められなかったが、雌に自発運動の減少が認められた。以上のこと及び本試験が約1カ月間の反復投与であることを考慮して、高用量は雌のLD₅₀値の1/4である 300mg/kg/dayとし、中間及び低用量は公比約3で 100及び 30mg/kg/day、さらに10%アラビアゴム溶液を投与する対照を設け、計4群とした(Table 1)。

動物数は1群あたり雌雄各12匹とした。群分けは、馴化期間の最終日（投与開始前日）に各群の体重が均一になるように体重別層化無作為抽出法により行った。

動物の識別は、受入時に油性フェルトペンを用いて尾部にケージ内個体識別を、群分け時に入墨により群識別を右耳に、群内個体識別を左耳に行った。ケージには性別毎に色分けしたカードに試験番号、試験群、グループ番号及び動物番号を明記して標示した。なお、新生児については、油性フェルトペンを用いて背部に雄は青色、雌は紫色で動物番号を記し、ケージ内個体識別を行った。

5. 被験物質の調製、投与経路及び投与方法

被験物質の調製は、用時に次の通り行った。被験物質を精秤し、0.3、1及び3 w/v%となるように 10 w/v%アラビアゴム溶液（日本薬局方アラビアゴム末：Lot No.10111及び 11209、山田製薬株式会社、局方精製水：Lot No.203075、204066及び 208060、ヤクハン製薬株式会社）で懸濁した。なお、MNP の調製液は規定の濃度かつ均一であることが住友化学工業株式会社により確認されている（平成4年10月13日付書類）。

投与経路は、被験物質が人体に経口的に暴露される可能性があることから、経口投与とした。投与は、胃ゾンデを用いて強制的に胃内に行った。投与容量は、体重1kg当たり10mlとして投与日に最も近い日に測定した体重に基づいて算出した。なお、体重測定当日の投与容量はその日の体重に基づいて算出した。

投与期間は、雄については交配前14日間及び交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は投与開始後46日までの期間、雌については交配前14日間及び交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間及び哺育3日までの期間とした。投与時刻は、午前10時から午後1時の間とした。

投与は10週齢から開始し、投与開始時の平均体重（体重範囲）は雄で 374.4g（331～407g）、雌で 226.3g（209～251g）であった。

6. 観察、測定及び検査項目

(1)雄動物について

①一般状態観察

全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で、視診及び触診により行動、外観などを観察した。また、発現した症状については、その種類及び持続時間を記録した。

②体重測定

全例について、投与1日（投与前）、投与2、5、7、10及び14日、その後は7日毎に（投与終了日を含む）、さらに剖検日に電子天秤（ザルトリウス 1401 B MP7-2及び 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。また、体重増加量〔投与46日体重－投与1日体重〕及び体重増加率〔（体重増加量／投与1日体重）×100〕を算出した。

③摂餌量測定

全例について、投与1日（投与前）、投与2、5、7、10及び14日、その後は交配期間を除き体重測定日と同じ日（投与終了日を含む）に電子天秤（ザルトリウス 1401 B MP7-2 及び 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。適当量の飼料をケージ毎にセットし、翌日に残量を測定し、1匹当たりの1日分の摂餌量を算出した。

④剖検及び器官重量測定

死亡例は発見後直ちに剖検した。交尾成立例は投与46日の翌日に、交尾不成立例は交配期間終了の翌日にエーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。摘出器官のうち、精巣及び精巣上体（左右）の重量を電子天秤（ER-180A、エー・アンド・ディ株式会社）を用いて測定した。また、器官体重重量比 $\left[\left(\text{器官重量} / \text{動物体重} \right) \times 100 \right]$ を算出した。

⑤病理組織学的検査

全例について、剖検時に肝臓、腎臓、脾臓、心臓、脳（大脳・小脳）、肺、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、脾臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、眼球、ハーダー腺、胸骨及び大腿骨（骨髓を含む）、脊髓（頸部）、骨格筋（外側広筋）、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精巣、精巣上体、精囊（凝固腺を含む）、前立腺及び異常所見部位を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。なお、眼球及びハーダー腺はデビッドソン液で、精巣及び精巣上体はブアン液で固定・保存した。摘出器官のうち、全例の精巣及び精巣上体、300mg/kg群の死亡した1例の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、胸腺、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び直腸について、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは特殊染色（PTAH染色）標本作製し、病理組織学的検査を行った。

(2)雌動物について

①一般状態観察

全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で、視診及び触診により行動、外観などを観察した。また、発現した症状については、その種類及び持続時間を記録した。

②体重測定

全例について、投与1日（投与前）、投与2、5、7、10及び14日、妊娠0、1、3、5、7、10、14、17及び20日、哺育0、1及び4日に、電子天秤（ザルトリウス 1401 B MP7-2及び 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。また、体重増加量〔（投与14日体重－投与1日体重）、（妊娠20日体重－妊娠0日体重）及び（哺育4日体重－哺育0日体重）〕、それぞれの体重増加量に対応した体重増加率〔（体重増加量／投与1日体重）× 100、（体重増加量／妊娠0日体重）× 100及び（体重増加量／哺育0日体重）× 100〕を算出した。

③摂餌量測定

全例について、投与1日（投与前）、投与2、5、7、10及び14日、妊娠1、3、5、7、10、14、17及び20日、哺育1及び4日に、電子天秤（ザルトリウス 1401 B MP7-2 及び 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。適当量の飼料をケージ毎にセットし、翌日に残量を測定し、1匹当たりの1日分の摂餌量を算出した。

④剖検及び器官重量測定

交尾成立例は哺育4日に、交尾不成立例は交配期間終了の翌日に、妊娠26日まで分娩の認められない例（不妊例）は妊娠27日に、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、子宮の着床痕及び卵巣の妊娠黄体を計数した。摘出器官のうち、卵巣（左右）の重量を電子天秤（ER-180A、エー・アンド・デイ株式会社）を用いて測定した。また、器官体重重量比〔（器官重量／動物体重）× 100〕を算出した。

⑤病理組織学的検査

全例について、剖検時に肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳（大脳・小脳）、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、脾臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、眼球、ハーダー腺、胸骨及び大腿骨（骨髓を含む）、脊髄（頸部）、骨格筋（外側広筋）、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、卵巣、子宮、陰及び異常所見部位を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。なお、眼球及びハーダー腺はデビッドソン液で固定・保存した。摘出器官のうち、全例の卵巣、30及び 100mg/kg 群の異常所見部位（肝臓、腎臓及び乳腺）について、パラフィン包埋後

薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

(3) 雌雄動物の生殖及び次世代の発生について

① 性周期検査

雌全例について、投与前10日から交尾成立までの連日、ギムザ染色による膣垢塗抹標本を作製し、光学顕微鏡下で性周期段階（発情前期、発情期前期、発情期後期、発情後期及び発情休止期）の判定を行い、性周期の異常の有無（正常または発情休止期継続、不規則発情）を検索した。

② 生殖能検査

投与14日の雌雄について、同試験群内で夕方より1対1で最長14日間同居させた。交尾の成立は雌の膣垢中に精子が確認された場合とし、妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とした。また、交尾率 $\left[\left(\text{交尾成立ラット数} / \text{同居ラット数} \right) \times 100 \right]$ 及び受胎率 $\left[\left(\text{受胎ラット数} / \text{交尾成立ラット数} \right) \times 100 \right]$ を算出した。

③ 分娩及び母性行動観察

交尾した雌全例について、分娩状態、母性行動、総出産児数、生存児数及び死亡児数、出産児の性別及び外表を観察した。また、着床率 $\left[\left(\text{着床痕数} / \text{妊娠黄体数} \right) \times 100 \right]$ 、出産率 $\left[\left(\text{生児を出産した雌ラット数} / \text{妊娠雌ラット数} \right) \times 100 \right]$ 、分娩率 $\left[\left(\text{総出産児数} / \text{着床痕数} \right) \times 100 \right]$ 、出生率 $\left[\left(\text{出産確認時生存児数} / \text{総出産児数} \right) \times 100 \right]$ 、哺育4日時哺育率 $\left[\left(\text{正常に哺育した雌ラット数} / \text{正常に分娩した雌ラット数} \right) \times 100 \right]$ 、性比 $\left[\text{雌生児数} / \text{雄生児数} \right]$ 及び妊娠期間 $\left[\text{分娩終了日} \left(\text{分娩終了を確認した日} \right) \text{までの妊娠日数} \right]$ を算出した。

④ 新生児の一般状態観察及び生存性

全例について、分娩終了日から剖検日（哺育4日）まで1日1回、生存及び死亡を確認し、一般状態及び外表について観察した。なお、哺育日数は分娩終了日を哺育0日として起算した。また、新生児生存率 $\left[\left(\text{哺育4日生存児数} / \text{出産確認時生存児数} \right) \times 100 \right]$ を1腹を単位として算出した。ただし、喰殺を受け死亡あるいは行方不明となった新生児は死亡例として扱った。

⑤ 新生児の体重測定

全例について、哺育0、1及び4日に電子天秤（ザルトリウス 1401 B MP7-2、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。なお、体重値は雌雄別に1腹を単位とした平均値で示した。また、体重増加量 $\left[\text{哺育4日体重} - \text{哺育0日体重} \right]$ 及び体重増加

率〔(体重増加量/哺育0日) × 100〕を算出した。

⑥新生児の剖検

死亡例は、直ちに剖検し、whole bodyを10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。その他の例については、哺育4日に体外表(口腔内を含む)を観察し、二酸化炭素吸入法により安楽致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。異常所見部位の認められた例については、whole bodyを10%中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。

7. 統計処理

体重、摂餌量、体重増加量及び体重増加率、器官重量、器官体重重量比、妊娠黄体数、着床痕数及び着床率、総出産児数、出産確認時生存児数、分娩率、出生率、性比、出産確認時死亡児数、妊娠期間、哺育4日生存児数及び新生児生存率については、Bartlettの検定法によって分散を検定した。その結果、等分散($p > 0.05$)を示した項目については一元配置分散分析法によって解析し、有意な場合($p < 0.10$)、Dunnettの検定法(各試料の大きさが違う場合は有効反復数を用いた)により対照群とMNP投与群との比較を行った。一方、不等分散($p < 0.05$)を示した項目についてはKruskal-Wallis法により解析し、有意な場合($p < 0.10$)、Mann-WhitneyのU-検定法により対照群とMNP投与群との比較を行った。なお、分娩及び母性行動観察結果、新生児の生存性及び体重については、1腹を単位として検定を行った。

交尾率、受胎率、出産率及び哺育率については多試料 χ^2 -検定を行い、その結果、有意な場合は2試料 χ^2 -検定を行った。ただし、2試料 χ^2 -検定あるいは多試料 χ^2 -検定に不適合の場合はFisherの正確確率検定法により行った。

なお、対照群との検定については、危険率5%以下を統計学的に有意とした。

成 績

1. 雄動物の反復投与毒性

(1) 一般状態観察

一般状態観察の成績を Table 2、INDIVIDUAL DATA 1-1~1-4 に示した。

300mg/kg群の1例で死亡が投与1日の投与後に認められた。本例は、自発運動の減少が投与17分後に、腹臥及び呼吸緩徐が24分後に認められ、32分後に死亡した。30及び100mg/kg群の全例及び300mg/kg群の死亡例を除く全例（11例）で黄色尿が投与3日以降の投与期間のほぼ全期間に認められ、このうち 300mg/kg 群の2例では陰囊部被毛の一部に黄染が投与 31日以降に認められた。

その他に症状は認められなかった。

(2) 体重推移

体重推移を Figure1、Table 3、INDIVIDUAL DATA 2-1~2-4に示した。

投与期間を通して、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(3) 摂餌量

摂餌量の変化を Figure 2、Table 4、INDIVIDUAL DATA 3-1~3-4に示した。

投与期間を通して、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(4) 器官重量

器官重量及び器官体重重量比の成績を Table 5、INDIVIDUAL DATA 4-1~4-4に示した。

対照群と比較して、100mg/kg群で精巢上体（左右）の重量及び精巢上体（右）の体重重量比の減少が認められたが、用量依存性を欠く変動であった。

(5) 剖検及び病理組織学的検査

剖検及び病理組織学的検査の成績を Table 6、7、INDIVIDUAL DATA 5-1~6-4 に示した。

300mg/kg群の死亡例では剖検で異常は認められなかった。本例の病理組織学的検査では、腎臓（右）、心臓及び肺に血栓形成が認められたが、肝臓、腎臓（左）、脾臓、脳、胸腺、副腎（左右）、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巢（左右）及び精巢上体（左右）に異常は認められなかった。

その他の例では MNP投与との関連を示唆する所見は認められず、交尾不成立例及び不妊例においてその原因を示唆する所見は認められなかった。なお、認められた所見は次

の通りであった。

外表所見として 300mg/kg 群の 2 例で陰囊部被毛の一部に黄染が認められた。剖検では、対照群の 2 例で精巢上体（右あるいは左）の尾部の黄白色斑がみられ、病理組織学的には精子肉芽腫が認められた。他に病理組織学的検査では 300mg/kg 群の 1 例で精巢（左）に精細管の萎縮が認められた。

2. 雌動物の反復投与毒性

(1) 一般状態観察

一般状態観察の成績を Table 8、INDIVIDUAL DATA 7-1～9-4 に示した。

30mg/kg 以上の群の全例で黄色尿が投与 3 日～哺育 4 日のほぼ全期間に認められた。このうち、300mg/kg 群の 2～4 例で外尿道口周囲被毛に黄染が投与 16 日～哺育 4 日に認められた。300mg/kg 群の 2 例で自発運動の減少あるいは腹臥、呼吸緩徐が妊娠 20 あるいは 21 日の投与 25 あるいは 35 分後より認められた。そのうち 1 例では呼吸緩徐及び自発運動の減少が投与 1 時間 46 分後まで継続して認められた。その他に 30mg/kg 群の 1 例で右頸部の皮下腫瘍が妊娠 17 日～哺育 4 日に、100mg/kg 群の 1 例で右前指の外傷及び腫脹が妊娠 16～22 日に、100mg/kg 群の他の 1 例で手足及び耳介の蒼白が妊娠 25 日（分娩終了日）～哺育 4 日に認められた。

(2) 体重推移

体重推移を Figure 3～5、Table 9～11、INDIVIDUAL DATA 10-1～12-4 に示した。

妊娠前投与期間、妊娠及び哺育期間を通して、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(3) 摂餌量

摂餌量の変化を Figure 6～8、Table 12～14、INDIVIDUAL DATA 13-1～15-4 に示した。

妊娠前投与期間では、対照群と比較して 100mg/kg 群で投与 1 及び 2 日に摂餌量の減少が認められたが、用量依存性を欠く変動であった。

妊娠期間では、対照群と比較して 30mg/kg 群で妊娠 3 日に摂餌量の増加が認められたが、用量依存性を欠く変動であった。

哺育期間では、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(4) 器官重量

器官重量及び器官体重重量比の成績を Table 15、INDIVIDUAL DATA 16-1~16-4 に示した。

対照群と比較して、有意な差は認められなかった。

(5) 剖検及び病理組織学的検査

剖検及び病理組織学的検査の成績を Table 16、17、INDIVIDUAL DATA 17-1~18-4 に示した。

MNP 投与との関連を示唆する所見は認められず、交尾不成立例及び不妊例においてその原因を示唆する所見は認められなかった。なお、認められた所見は次の通りであった。

外表所見として、300mg/kg 群の4例で尿道口周囲被毛の黄染が、100mg/kg 群の1例（腎臓に褪色がみられた例）で手足及び耳介の蒼白が認められた。剖検では、100mg/kg 群の1例で肝臓右葉に白色斑、100mg/kg群の他の1例で腎臓（左右）の褪色が、30mg/kg 群の1例で右頸部の皮下白色腫瘤がみられ、病理組織学的検査ではそれらに対応して肝臓に限局性の肝細胞壊死、腎臓（左右）に形成異常、乳腺に乳頭腺管癌が認められた。なお、腎臓の形成異常の特徴像は糸球体及び尿細管の非同調性分化であり、二次的変化と考えられる遠位を主とする尿細管の拡張及び尿細管上皮の萎縮、線維化、皮質における石灰沈着も認められた。

3. 雌雄動物の生殖毒性及び次世代の発生毒性

(1) 生殖能検査

生殖能検査の成績を Table 18、INDIVIDUAL DATA 19-1-1~19-4-2 に示した。

雌の性周期検査では、100mg/kg群における交尾不成立の1例で交配開始後発情休止期の継続が認められたが、その他の例では正常な性周期を示し、投与前期間と投与期間の性周期に MNP投与との関連を示唆する変化は認められなかった。

対照群と比較して、交尾までの日数、交尾率及び受胎率に有意な差は認められなかった。なお、交尾不成立例は 100mg/kg群で1組、不妊例は対照群で2組、30mg/kg群で1組、100mg/kg群で1組に認められた。

(2) 分娩及び母性行動観察

分娩及び母性行動観察の成績を Table 19、INDIVIDUAL DATA 20-1~20-4 に示した。

対照群と比較して、妊娠黄体数、着床痕数、着床率、総出産児数、出産確認時生存児数、分娩率、出生率、性比、出産確認時死亡児数、妊娠期間、出産率及び哺育4日時哺

育率について有意な差は認められなかった。

分娩異常として、100mg/kg群の1例で遷延分娩及び妊娠期間の延長が認められた。本例は、妊娠21日に分娩を開始し、分娩中（妊娠23及び24日）に4匹の死亡児（うち1匹は喰殺を受けていた）が認められ、妊娠25日の朝に10匹の生存児をもって分娩の終了が確認された。なお、本例は前述した様に分娩終了日及び哺育期間中に手足及び耳介の蒼白、腎臓（左右）に褪色及び形成異常が認められた。また、哺育期間中には1匹の死亡児が哺育3日に確認されたが、残りの9匹は哺育4日まで全例哺育し、本例の哺育については正常であると判断された。

(3) 新生児の生存性

新生児の生存性の成績を Table 20、INDIVIDUAL DATA 21-1～21-4に示した。

対照群と比較して、新生児生存率に有意な差は認められなかった。

(4) 新生児の一般状態観察

新生児の一般状態観察の成績を Table 21、INDIVIDUAL DATA 22-1～22-4に示した。

雌雄ともに MNP投与との関連を示唆する症状は認められなかった。なお、認められた症状は次の通りであった。

対照群では、雄 60例雌 71例中雌雄各1例で死亡が哺育1日に認められた。30mg/kg群では、雄 84例雌 72例中雄1例雌2例で死亡が哺育1～2日に、雄1例で臍帯部の皮膚の剥離及び痂皮が分娩日～哺育2日に認められた。100mg/kg群では、雄 65例雌 68例中雄1例で死亡が哺育3日に、雌1例で右大腿部内側に外傷、出血及び痂皮が分娩日～哺育4日に、雄1例で右胸部及び右腹部の痂皮が哺育4日に認められた。300mg/kg群では、雄 71例雌 88例中雄1例雌2例で死亡が哺育1日に認められた。

(5) 新生児の体重推移

新生児の体重推移を Figure 9、Table 22、INDIVIDUAL DATA 23-1～23-4に示した。

対照群と比較して、100mg/kg群の雄で体重増加量の増加が認められたが、用量依存性を欠く変動であり、順調な体重増加と判断された。

(6) 新生児の剖検

新生児の剖検の成績を Table 23、INDIVIDUAL DATA 24-1-1～24-4-2に示した。

雌雄ともに MNP投与との関連を示唆する所見は認められなかった。なお、認められた所見は次の通りであった。

外表所見として、哺育4日に屠殺した100mg/kg群の雌雄各1例で右胸部及び右腹部、右大腿部内側に痂皮が認められた。

考 察

MNP の 30、100及び 300mg/kg/day を雄ラットの交配前及び交配期間を含む46日間、雌ラットの交配前、交配及び妊娠期間、哺育3日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖及び次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験を実施した。

MNP投与による死亡が 300mg/kg群の雄1例で投与1日の投与32分後に認められた。本例では死亡前に自発運動の減少、腹臥及び呼吸緩徐が認められ、MNPの 500～2500mg/kgを単回投与した場合と類似の症状であった¹⁾。本例の病理組織学的検査では腎臓、心臓及び肺に血栓形成が認められ、循環障害による急性死亡と考えられた。死亡例でみられた症状は 300mg/kg群の雌2例で妊娠20あるいは21日に認められた。しかしながら、雌では死亡に至らず、妊娠維持や分娩に影響を及ぼすものではなかった。一般状態観察では他に黄色尿が死亡例を除く 30mg/kg以上の群の雌雄全例で投与期間中にみられ、300mg/kg群の一部の例には被毛の黄染も認められた。MNPが淡黄褐色を呈することから、MNPあるいはその代謝物が尿中に排泄され、尿を黄色化していることが推測された。なお、黄色尿観察例について尿の定性試験を実施したところ、MNP投与群で尿 pHが低下する傾向がみられたが、他に対照群との差は認められなかった (Appendix 1)。

その他に体重推移及び摂餌量では MNP投与による影響は認められなかった。

以上より、MNP投与による毒性は 300mg/kg群において死亡が雄1例に認められたこと、自発運動の減少、腹臥及び呼吸緩徐が死亡例及び雌2例に認められたことであった。これらのことから、本スクリーニング試験における MNP反復投与による無影響量 (NOEL) は雌雄ともに 100mg/kg/dayであることが示唆された。

生殖能検査では、雌の性周期、雌雄の交尾及び受胎に対して MNP投与による影響は認められなかった。また、生殖器 (精巢、精巢上体及び卵巣) の重量や病理組織学的検査においても MNP投与による影響は認められなかった。なお、交尾不成立例及び不妊例の生殖器にそれらの原因を示唆する病理組織学的所見は認められなかった。

分娩及び母性行動観察では、分娩異常として 100mg/kg 群の1例で遷延分娩及び妊娠期間の延長が認められた。本例では腎臓に褪色及び形成異常、分娩終了日及び哺育期間中に手足及び耳介の蒼白が認められ、これらと分娩異常との関連が考えられた。しかしながら、同様な分娩異常は高用量群に認められないことから、本例は偶発的な出現と判断され、

MNP投与との関連性はないものと考えられた。

その他に 30mg/kg 群の母動物 1 例で乳頭腺管癌が認められた。同所見は、背景データ (Appendix 2) でみられ、本試験では高用量群に認められないことから、MNP投与との関連はないものと考えられた。なお、本例の妊娠及び哺育に関しては正常であった。

新生児の観察では、生存性、一般状態観察、体重推移及び剖検において MNP投与による影響は認められなかった。

以上より、MNP の生殖・発生に対する影響は認められないことから、本スクリーニング試験における MNPの雌雄動物の生殖及び次世代の発生に対する無影響量は 300mg/kg/day であることが示唆された。

参考文献

- 1) . p-ニトロメタクレゾールのマウスならびにラットに対する急性毒性試験.

Figures

- Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Figure 9. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity study of MNP in rats

Tables

- Table 1. Experimental design for the preliminary reproduction toxicity study of MNP in rats
- Table 2. General appearance of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 5. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 6. Gross findings of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

- Table 7. Histopathological findings of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 8. General appearance of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 9. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 10. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 11. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 12. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 13. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 14. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 15. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 16. Gross findings of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 17. Histopathological findings of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study
- Table 18. Influence of MNP on reproductive ability in the preliminary reproduction toxicity study in rats
- Table 19. Influence of MNP on delivery and maternal behavior in the preliminary reproduction toxicity study in rats
- Table 20. Influence of MNP on viability of pups in the preliminary reproduction toxicity study in rats
- Table 21. General appearance of pups in the preliminary reproduction toxicity study of MNP in rats
- Table 22. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity study of MNP in rats
- Table 23. Gross findings of pups in the preliminary reproduction toxicity study of MNP in rats
-

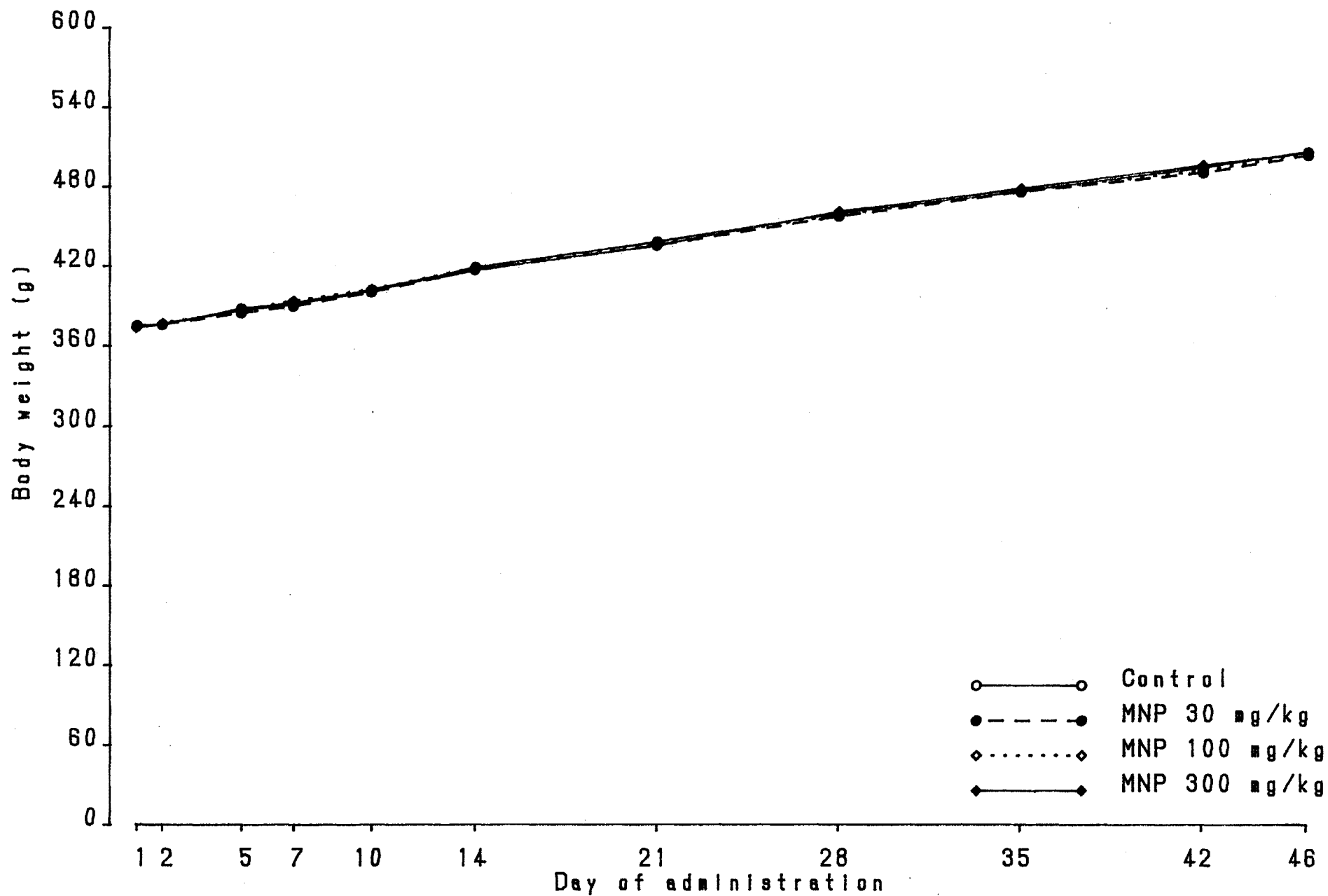


Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

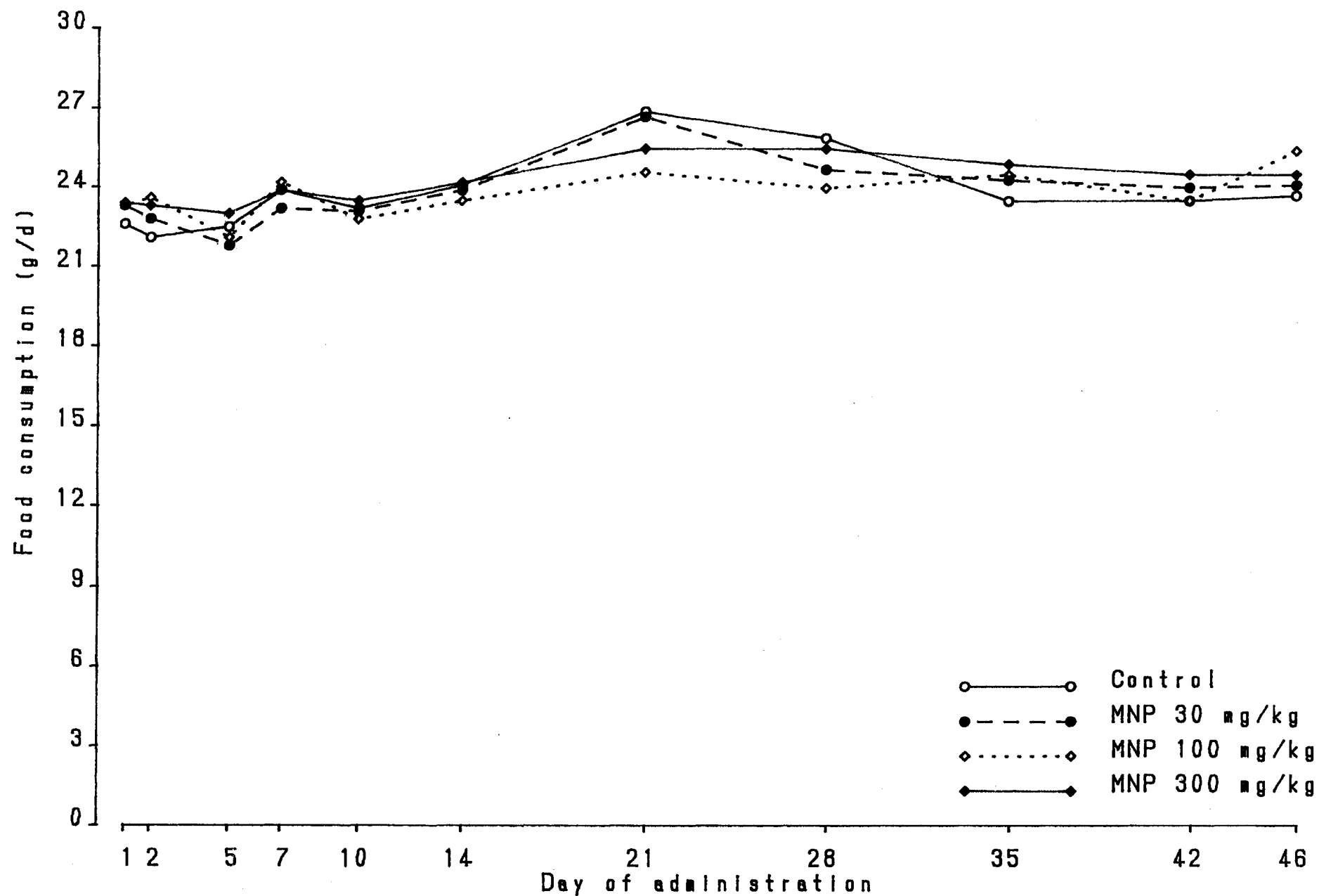


Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

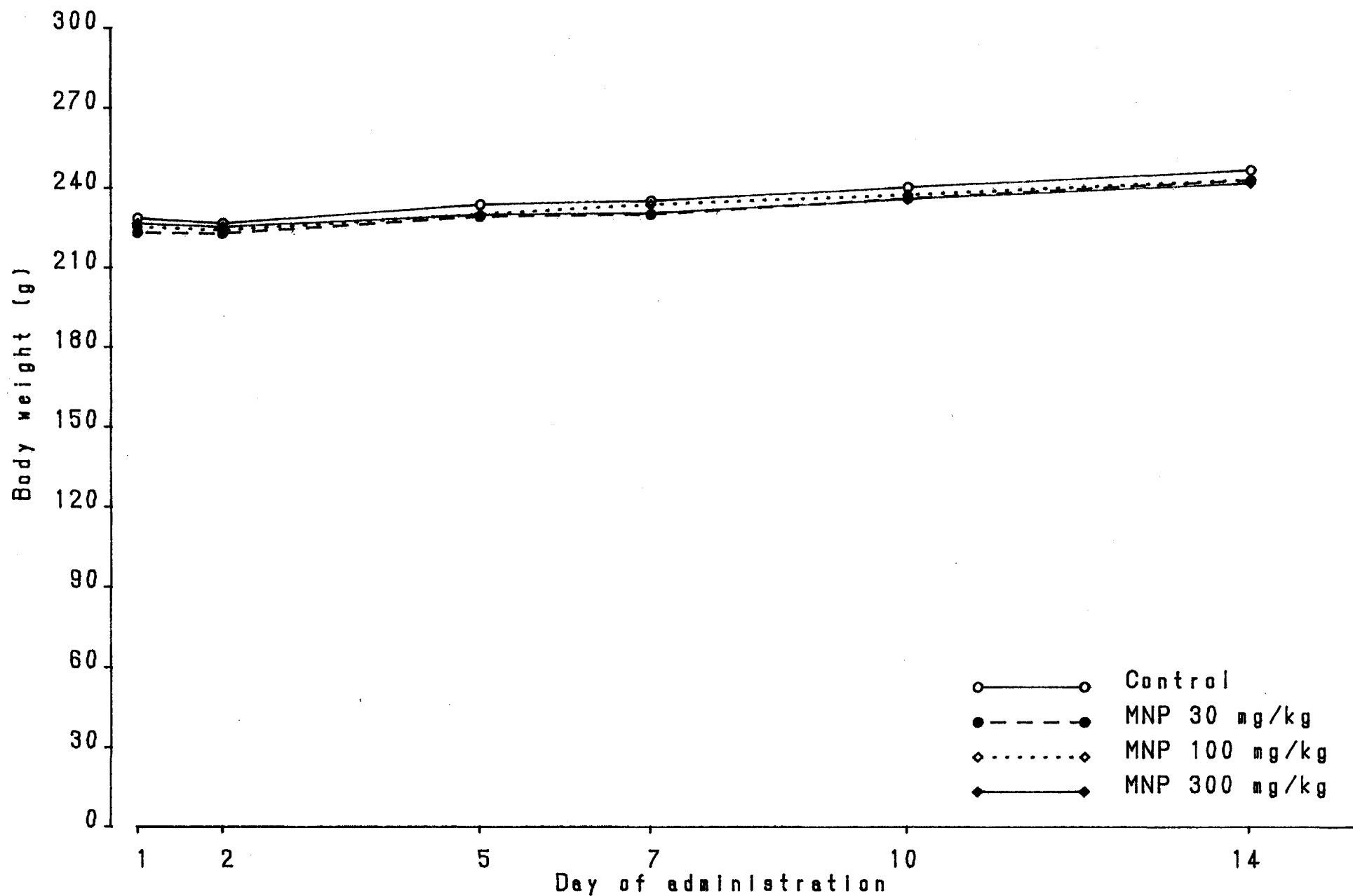


Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

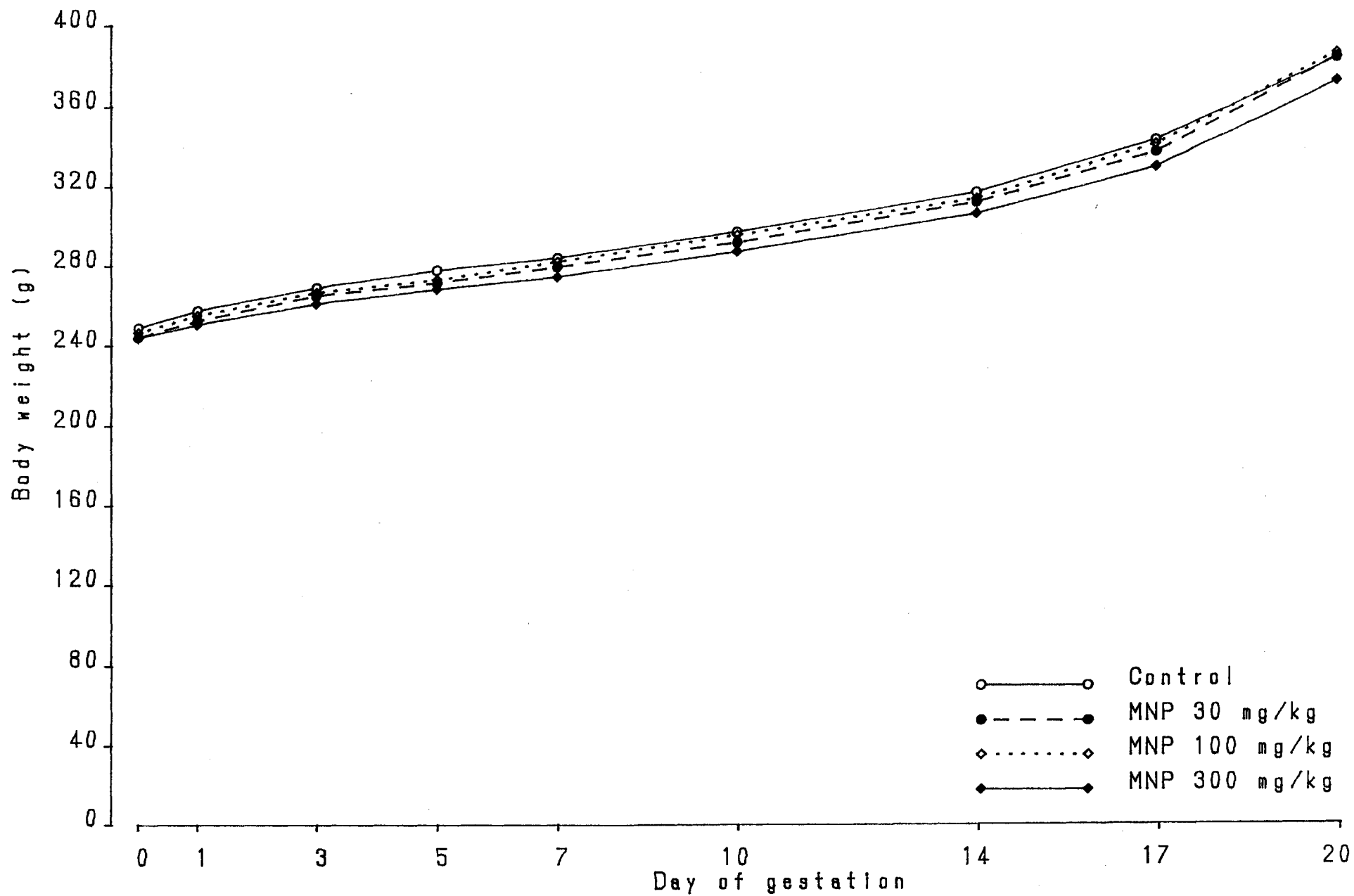


Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

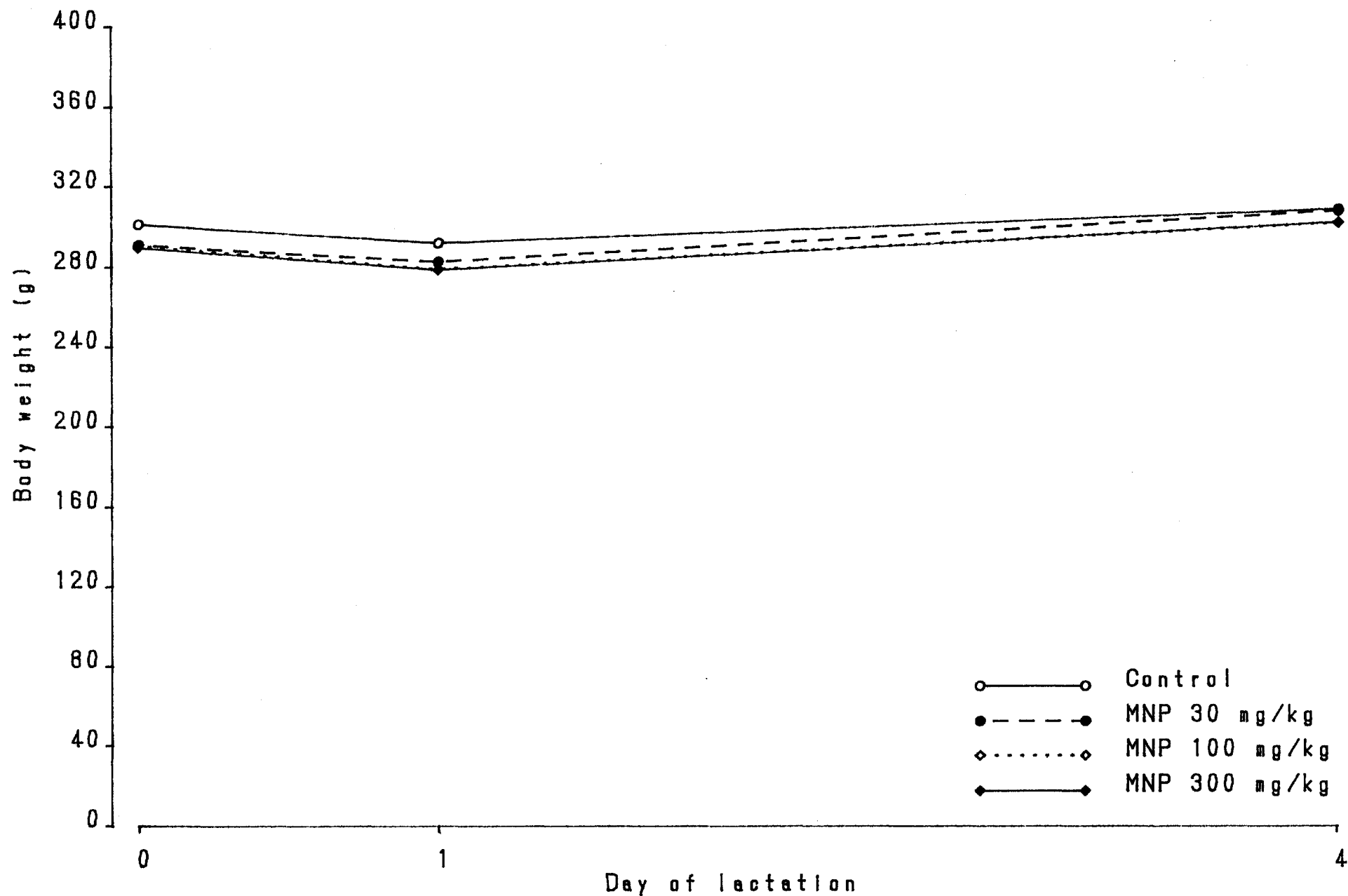


Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

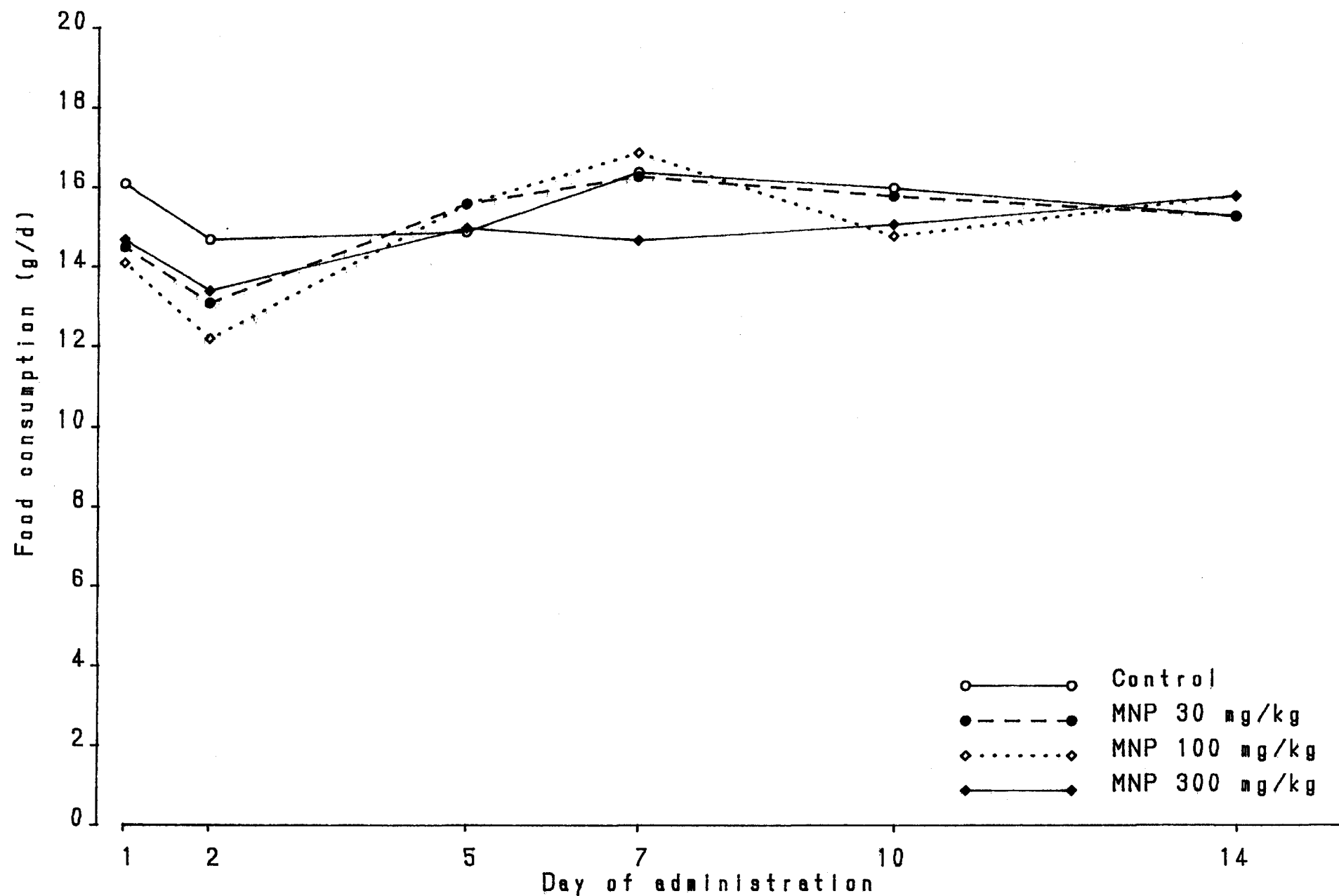


Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

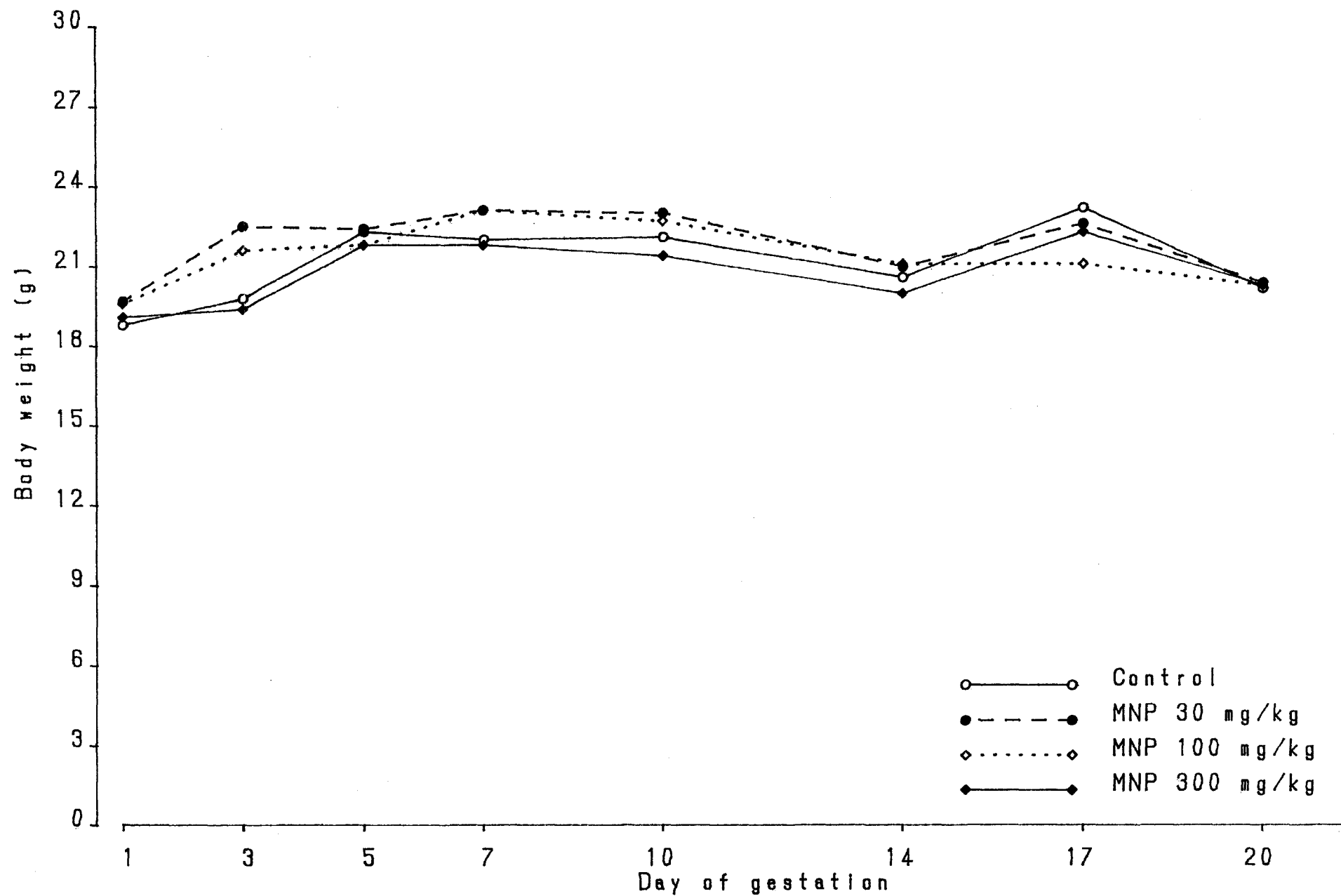


Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

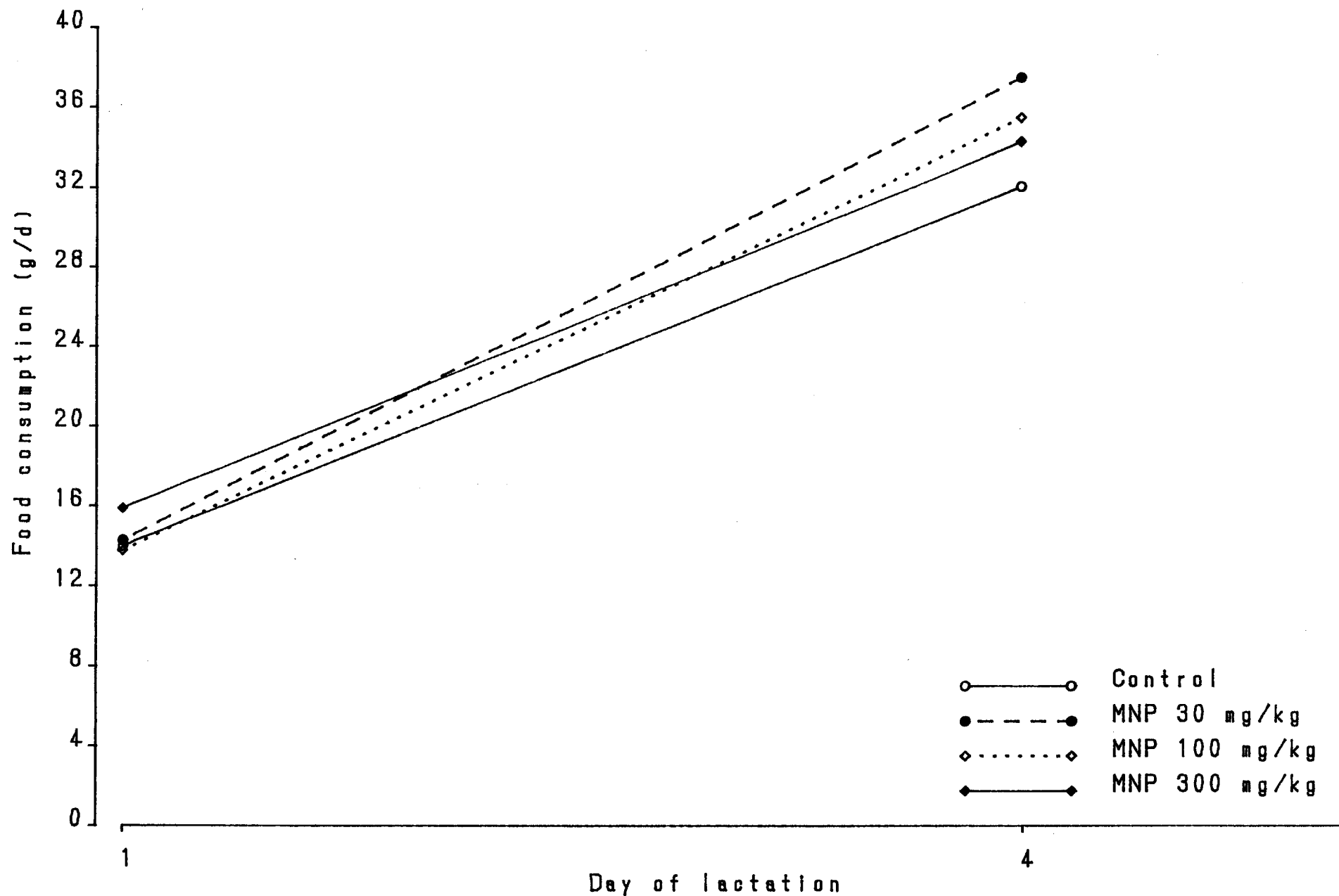


Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

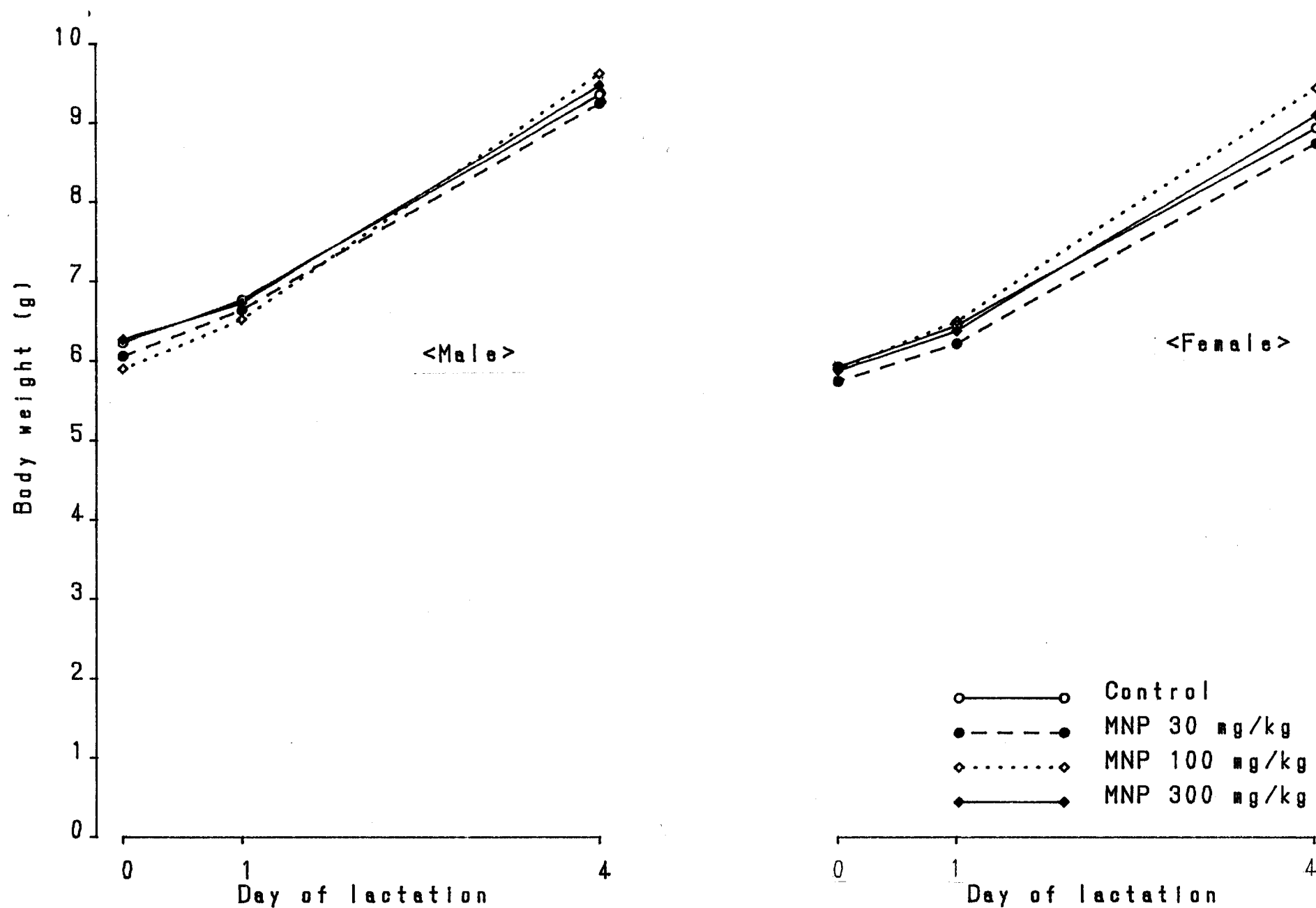


Figure 9. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity study of MNP in rats

Table 1. Experimental design for the preliminary reproduction toxicity study of MNP in rats

Group	Concentration of MNP (w/v %)	Volume (ml/kg)	a No. of animals	
			Male	Female
b Control	-	10	12	12
c MNP 30 mg/kg	0.3	10	12	12
MNP 100 mg/kg	1	10	12	12
MNP 300 mg/kg	3	10	12	12

a: MNP (3-methyl-4-nitrophenol) was dosed orally to male rats for 46 days included before mating and mating period, and to female rats from day 14 before mating to day 3 of lactation.

b: Control was 10% gum arabic dissolved in distilled water.

c: MNP was suspended in control solution.

Table 2. General appearance of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Item	Control	MNP (mg/kg)		
		30	100	300
No. of animals examined	12	12	12	12
	^a			
Death	0	0	0	1
Decrease in spontaneous activity	0	0	0	1
Prone position	0	0	0	1
Bradypnea	0	0	0	1
Yellow urine	0	12	12	11
Partial yellow soiling hair of scrotum	0	0	0	2

a: Values are no. of animals with findings.

Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Group	No. of animals	Day of administration											Body weight gain	
		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46	Day 1-46	% a
Control	12	^b 375.4	376.2	388.0	392.6	402.6	419.2	438.8	460.9	477.2	494.8	506.6	131.167	34.868
		17.9	17.5	20.3	18.6	21.2	26.0	25.9	27.5	30.8	32.3	34.5	20.705	4.712
MNP 30 mg/kg	12	374.4	376.2	384.9	390.3	401.0	417.6	436.3	458.4	477.0	491.1	504.2	129.750	34.568
		14.3	14.1	16.6	19.1	20.5	23.2	22.4	23.6	27.7	28.8	29.9	17.126	3.597
MNP 100 mg/kg	12									(11) ^c	(11)	(11)	(11)	(11)
		374.0	376.9	387.0	394.1	403.1	419.2	438.1	459.7	477.9	492.5	505.9	133.000	35.606
		19.1	17.8	20.2	22.4	24.4	26.9	26.4	29.1	32.7	34.4	34.7	19.401	4.397
MNP 300 mg/kg	12		(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
		373.8	376.5	387.0	391.3	402.0	417.5	436.0	462.1	479.5	496.6	506.7	132.909	35.523
		17.4	18.8	19.6	19.7	20.8	23.1	24.1	27.2	28.6	30.4	31.4	18.371	4.562

a: (Body weight gain / body weight on day 1) x 100.

b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

c: Values in parentheses are no. of animals examined.

Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Group	No. of animals	Day of administration										
		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46
Control	12	^a 22.6	22.1	22.5	23.9	23.2	24.1	26.9	25.9	23.5	23.5	23.7
		2.7	1.9	2.4	2.6	2.9	2.4	2.6	2.4	3.0	2.4	2.5
MNP 30 mg/kg	12	23.3	22.8	21.8	23.2	23.1	23.9	26.7	24.7	24.3	24.0	24.1
		2.2	3.5	1.9	2.0	2.2	2.3	2.6	2.3	2.1	2.3	3.1
MNP 100 mg/kg	12	23.3	23.6	22.1	24.2	22.8	23.5	(11)b	(11)	(11)	(11)	(11)
		2.7	2.4	2.5	2.2	2.5	2.9	3.1	3.0	2.6	2.1	2.8
MNP 300 mg/kg	12	23.4	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
		2.5	2.9	2.5	1.6	3.4	2.4	2.4	3.0	2.4	2.9	2.9

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.

b: Values in parentheses are no. of animals examined.

Table 5. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Group	No. of animals	Body weight g	Testis				Epididymis			
			Right		Left		Right		Left	
			g	%	g	%	g	%	g	%
Control	12	510.3 ^a	1.685	0.331	1.663	0.327	0.692	0.136	0.675	0.134
		33.9	0.134	0.017	0.108	0.014	0.034	0.009	0.032	0.009
MNP 30 mg/kg	12	506.8	1.627	0.321	1.628	0.323	0.658	0.129	0.648	0.129
		30.6	0.106	0.028	0.109	0.024	0.066	0.015	0.052	0.014
MNP 100 mg/kg	12	503.6	1.633	0.326	1.604	0.318	0.628**	0.123*	0.612**	0.123
		35.7	0.107	0.022	0.138	0.031	0.033	0.010	0.040	0.010
MNP 300 mg/kg	11	508.9	1.628	0.322	1.586	0.314	0.660	0.131	0.635	0.125
		30.4	0.110	0.032	0.148	0.038	0.048	0.014	0.061	0.014

a: Values are means and S.D. thereunder.

*: Differs from control, $p < 0.05$.

**: Differs from control, $p < 0.01$.

Table 6. Gross findings of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Item	Control	MNP (mg/kg)		
		30	100	300
Total no. of animals examined	12	12	12	12
Findings of dead animals				
No. of dead animals	0	0	0	1
	^a			^b
Abnormal findings	-	-	-	0
Findings of surviving animals				
No. of surviving animals	12	12	12	11
Epididymis (right/left) : Yellowish white patch on tail	2	0	0	0
Partial yellow soiling hair of scrotum	0	0	0	2

a: - = blank value.

b: Values are no. of animals with findings.

Table 7. Histopathological findings of male rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Item	Grade ^a	Control	MNP (mg/kg)		
			30	100	300
^b					
No. of dead animals examined		0	0	0	1
		^c			^d
Kidney (right) : Thrombus formation	+	-	-	-	1
Heart : Thrombus formation	+	-	-	-	1
Lung : Thrombus formation	+	-	-	-	1
No. of surviving animals examined		12	12	12	11
Testis (left) : Atrophy of tubules	+	0	0	0	1
Epididymis (right/left) : Spermatic granuloma	+	2	0	0	0

a: + = slight change.

b: There were no abnormal findings in the liver, spleen, cerebrum, cerebellum, thymus, adrenal, forestomach, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, testis and epididymis.

c: - = blank value.

d: Values are no. of animals with findings.

Table 8. General appearance of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Item	Control	MNP (mg/kg)		
		30	100	300
<Before gestation period>				
No. of animals examined	12	12	12	12
	a			
Yellow urine	0	12	12	12
Yellow soiling hair of perigenital region	0	0	0	2
<Gestation period>				
No. of animals examined	12	12	b 11	12
Decrease in spontaneous activity	0	0	0	2
Prone position	0	0	0	1
Bradypnea	0	0	0	2
Yellow urine	0	12	11	12
Yellow soiling hair of perigenital region	0	0	0	3
Subcutaneous mass in right cervical region	0	1	0	0
Pale discoloration of forefeet, feet and auricles	0	0	1	0
Trauma and swelling of right forefoot	0	0	1	0
<Lactation period>				
No. of animals examined	10	11	10	12
Yellow soiling hair of perigenital region	0	0	0	4
Subcutaneous mass in right cervical region	0	1	0	0
Pale discoloration of forefeet, feet and auricles	0	0	1	0

a: Values are no. of animals with findings.

b: Excludes one animal because of error in confirming successful copulation.

Table 9. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Group	No. of animals	Day of administration						Body weight gain	
		1	2	5	7	10	14	Day 1-14	% a
Control	12	b							
		228.9	226.8	233.9	235.3	240.5	247.0	18.083	7.869
		11.0	14.2	12.5	11.4	13.5	14.4	5.696	2.374
MNP 30 mg/kg	12	223.5	223.1	229.5	230.3	236.3	243.2	19.667	8.813
		6.1	7.7	7.5	7.5	7.8	8.7	6.814	3.107
MNP 100 mg/kg	12	225.7	224.2	230.3	233.8	237.7	243.5	17.833	7.893
		8.6	10.4	10.3	9.6	9.8	10.7	4.218	1.830
MNP 300 mg/kg	12	226.9	225.4	230.1	230.6	236.1	242.1	15.167	6.673
		8.6	7.6	8.5	10.6	9.2	10.7	4.239	1.849

a: (Body weight gain / body weight on day 1) x 100.

b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 10. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Group	No. of animals	Day of gestation									Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	17	20	Day 0-20	% a
b												
Control	10	249.1	257.7	269.1	278.1	284.2	297.3	317.3	343.2	383.7	134.600	54.042
		11.2	10.2	11.2	8.6	11.5	13.9	15.0	14.0	19.1	10.490	3.565
MNP 30 mg/kg	11	244.5	252.7	265.3	271.7	279.5	291.9	312.1	337.2	384.0	139.455	57.109
		9.7	11.0	10.5	9.7	9.7	9.6	11.2	12.2	18.3	15.501	6.648
MNP 100 mg/kg	9	246.8	255.4	266.9	273.3	282.3	295.7	314.1	341.2	386.0	139.222	56.429
		10.5	12.8	10.6	12.5	13.1	15.6	17.2	18.3	17.7	9.692	3.332
MNP 300 mg/kg	12	243.8	250.7	261.2	268.3	274.4	287.2	306.2	329.7	372.1	128.250	52.725
		13.6	12.4	12.0	12.7	13.4	12.5	13.2	15.7	21.8	15.841	6.889

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.

b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 11. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Group	No. of animals	Day of lactation			Body weight gain	
		0	1	4	Day 0-4	% a
		b				
Control	10	301.4	292.5	309.1	7.700	2.753
		21.0	14.0	15.8	13.005	4.670
MNP 30 mg/kg	11	291.4	283.0	308.5	17.182	6.116
		14.4	12.0	16.3	20.951	7.502
MNP 100 mg/kg	10	290.7	279.2	302.6	11.900	4.202
		15.9	12.3	15.9	12.931	4.739
MNP 300 mg/kg	12	290.0	279.0	302.8	12.833	4.519
		15.2	15.4	14.1	10.878	3.856

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.

b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 12. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Group	No. of animals	Day of administration					
		1	2	5	7	10	14
Control	12	a					
		16.1	14.7	14.9	16.4	16.0	15.3
		1.5	2.9	1.8	2.0	2.0	3.0
MNP 30 mg/kg	12	14.5	13.1	15.6	16.3	15.8	15.3
		1.8	2.3	2.2	1.9	2.1	2.9
MNP 100 mg/kg	12	14.1*	12.2*	15.6	16.9	14.8	15.8
		1.9	2.7	1.6	2.4	2.3	1.9
MNP 300 mg/kg	12	14.7	13.4	15.0	14.7	15.1	15.8
		1.5	1.4	2.0	2.3	1.6	1.8

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.

*: Differs from control, $p < 0.05$.

Table 13. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Group	No. of animals	Day of gestation							
		1	3	5	7	10	14	17	20
Control	10	^a 18.8	19.8	22.3	22.0	22.1	20.6	23.2	20.2
		2.2	1.5	2.2	1.6	3.3	1.3	2.9	1.8
MNP 30 mg/kg	11	19.7	22.5*	22.4	23.1	23.0	21.0	22.6	20.4
		1.7	3.2	3.2	2.5	3.0	2.4	3.2	2.2
MNP 100 mg/kg	9	19.6	21.6	21.8	23.1	22.7	21.1	21.1	20.3
		1.7	1.8	2.4	2.8	2.2	2.6	2.8	1.2
MNP 300 mg/kg	12	19.1	19.4	21.8	21.8	21.4	20.0	22.3	20.3
		2.4	1.7	2.3	2.5	1.4	1.4	3.1	1.7

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.

*: Differs from control, $p < 0.05$.

Table 14. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Group	No. of animals	Day of lactation	
		1	4
Control	10	a	(9)b
		14.0	32.1
		4.2	2.3
MNP 30 mg/kg	11	14.3	37.5
		6.7	8.1
MNP 100 mg/kg	10	13.8	35.5
		6.4	5.1
MNP 300 mg/kg	12	15.9	34.3
		8.6	6.1

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.

b: Values in parentheses are no. of animals examined.

Table 15. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Group	No. of animals	Body weight g	Ovary			
			Right		Left	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Control	10	309.1 ^a	51.3	16.621	51.3	16.601
		15.8	6.3	2.037	9.4	2.904
MNP 30 mg/kg	11	308.5	54.9	17.832	52.1	16.926
		16.3	12.2	4.086	5.2	1.911
MNP 100 mg/kg	10	302.6	54.5	18.039	50.0	16.511
		15.9	2.5	0.974	9.2	2.920
MNP 300 mg/kg	12	302.8	55.7	18.440	51.6	17.038
		14.1	10.0	3.515	10.1	3.219

a: Values are means and S.D. thereunder.

Table 16. Gross findings of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Item	Control	MNP (mg/kg)		
		30	100	300
No. of animals examined	12	12	12	12
	^a			
Liver : White patch on right lobe	0	0	1	0
Kidneys : Pale discoloration	0	0	1	0
Skin of right cervical region : Subcutaneous white mass	0	1	0	0
Yellow soiling hair of perigenital region	0	0	0	4
Pale discoloration of forefeet, feet and auricles	0	0	1	0

a: Values are no. of animals with findings.

Table 17. Histopathological findings of female rats dosed orally with MNP in the preliminary reproduction toxicity study

Item	Grade ^a	Control	MNP (mg/kg)		
			30	100	300
No. of animals examined		12	12	12	12
Liver : Focal necrosis of hepatocytes	+	- ^b	-	c d 1 (1)	-
Kidneys : Dysplasia ^e	+	-	-	1 (1)	-
Mammary gland : Papillotubular carcinoma	+	-	1 (1)	-	-

There were no abnormal findings in the ovary.

a: + = slight change.

b: - = not examined.

c: Values are no. of animals with findings.

d: Values in parentheses are no. of animals examined.

e: Characterized by asynchronous differentiation of glomeruli and tubules.

Dilation of tubules, mainly distal tubules, atrophy of tubular epithelium, mainly distal tubules, fibrosis and calcium deposition in cortex were observed as secondary change.

Table 18. Influence of MNP on reproductive ability in the preliminary reproduction toxicity study in rats

Group	No. of pairs mated	Estrous cycle								No. of pairs with successful copulation	Days between the starting of mating and copulation	Copulation index % ^a	No. of pregnant animals	Fertility index % ^b
		Before administration				Administration period								
		Normal	Abnormal			Normal	Abnormal							
			Total	Continuous diestrus	Irregular		Total	Continuous diestrus	Irregular					
Control	12	12	0	- ^c	-	12	0	-	-	12	2.3±1.4 ^d	100.0	10	83.3
MNP 30 mg/kg	12	12	0	-	-	12	0	-	-	12	2.3±1.2	100.0	11	91.7
MNP 100 mg/kg	12	12	0	-	-	11	1	1 ^e	0	11	2.5±1.4	91.7	10	90.9
MNP 300 mg/kg	12	12	0	-	-	12	0	-	-	12	2.2±1.4	100.0	12	100.0

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

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

c: - = blank value.

d: Values are means ± S.D.

e: During mating.

Table 19. Influence of MNP on delivery and maternal behavior in the preliminary reproduction toxicity study in rats

Group		No. of pregnant females	No. of corpora lutea	No. of implan- tation sites	Implan- tation index %	No. of pups born	Delivery index %	Live pups born					Dead pups born			Gestation length day	Gestation index %	Nursing index %	
								No.	Live birth index %	Sex ratio	Male	Female	No.	Male	Female				
Control	Total	10	157	147		131		131			60	71	0	0	0				
	Mean		15.7	14.7	93.923	13.1	89.509	13.1	100.000	2.180	6.0	7.1	0.0			21.4	100.0	100.0	
	S.D.		1.8	1.6	7.133	2.4	14.728	2.4	0.000	3.487	2.4	2.6	0.0			0.5			
MNP 30 mg/kg	Total	11	188	167		157		156			84	72	^g 1	0	0				
	Mean		17.1	15.2	90.753	14.3	94.156	14.2	99.394	1.113	7.6	6.5	0.1	0.0	0.0		21.5	100.0	100.0
	S.D.		3.3	1.1	12.263	1.6	9.056	1.5	2.011	0.900	2.7	2.4	0.3			0.5			
MNP 100 mg/kg	Total	10	176	148		138		133			65	68	^g 5	4	0		^h 90.0		
	Mean		17.6	14.8	85.333	13.8	93.159	13.3	96.476	1.870	6.5	6.9	0.5	2.0	0.0		21.9		100.0
	S.D.		2.4	1.0	11.452	1.3	4.829	1.7	9.046	2.580	2.8	2.7	1.3	1.4	0.0		1.2		
MNP 300 mg/kg	Total	12	199	171		160		159			71	88	1	1	0				
	Mean		16.6	14.3	86.681	13.3	95.510	13.3	99.479	1.610	5.9	7.3	0.1	1.0	0.0		21.5	100.0	100.0
	S.D.		2.6	2.3	13.669	2.8	10.254	2.8	1.804	1.061	2.4	2.0	0.3			0.5			

a: (No. of implantation sites / no. of corpora lutea) x 100, using the litter as a unit of treatment.

b: (No. of pups born / no. of implantation sites) x 100, expressed in the same way as above.

c: (No. of live pups born / no. of pups born) x 100, expressed in the same way as above.

d: (No. of female pups / no. of male pups), expressed in the same way as above.

e: (No. of females with live pups / no. of pregnant females) x 100.

f: (No. of females with normal nursing / no. of females with complete delivery) x 100.

g: Includes 1 pup of unknown sex.

h: One of 10 pregnant females had prolonged delivery and gestation length.

Table 20. Influence of MNP on viability of pups in the preliminary reproduction toxicity study in rats

Item	No. of live pups born (on day 0)	Live pups on day 4			
		No.	Viability index %	Male	Female
Control	131	129		59	70
	13.1	12.9	98.708	5.9	7.0
	2.4	2.2	2.726	2.3	2.6
MNP 30 mg/kg	156	153		83	70
	14.2	13.9	98.126	7.5	6.4
	1.5	1.5	3.226	2.7	2.3
MNP 100 mg/kg	133	132		64	68
	13.3	13.2	99.000	6.4	6.8
	1.7	1.9	3.162	3.0	2.7
MNP 300 mg/kg	159	156		70	86
	13.3	13.0	98.214	5.8	7.2
	2.8	2.8	4.441	2.4	2.0

a: (No. of live pups on day 4 / no. of live pups born) x 100, using the litter as a unit of treatment.

Table 21. General appearance of pups in the preliminary reproduction toxicity study of MNP in rats

Item	Male				Female			
	Control	MNP (mg/kg)			Control	MNP (mg/kg)		
		30	100	300		30	100	300
No. of animals examined	^a 60	84	65	71	71	72	68	88
^b Death	^c 1	1	1	1	1	2	0	2
Detachment of skin and scab of umbilical region	0	1	0	0	0	0	0	0
Scab of right thoracic and right abdominal region	0	0	1	0	0	0	0	0
Trauma, bleeding and scab of right medial femoral region	0	0	0	0	0	0	1	0

a: Values are no. of live animals at birth.

b: Includes missing.

c: Values are no. of animals with findings.

Table 22. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity study of MNP in rats

Group	No. of litters	Male					Female				
		Day of lactation			Body weight gain		Day of lactation			Body weight gain	
		0	1	4	Day 0-4	% a	0	1	4	Day 0-4	% a
Control	10	b									
		6.23	6.77	9.36	3.130	50.057	5.93	6.45	8.94	3.010	50.749
		0.50	0.73	0.95	0.501	5.166	0.52	0.75	0.90	0.502	6.652
MNP 30 mg/kg	11	6.06	6.64	9.25	3.191	52.311	5.75	6.22	8.75	2.991	51.436
		0.38	0.64	1.02	0.683	8.570	0.39	0.72	1.24	0.902	12.248
MNP 100 mg/kg	10			(9)b	(9)	(9)					
		5.90	6.52	9.63	3.556	58.306*	5.91	6.50	9.45	3.540	59.650
		0.73	0.98	1.05	0.627	7.912	0.47	0.50	1.05	0.657	8.229
MNP 300 mg/kg	12	6.27	6.73	9.48	3.217	51.033	5.88	6.38	9.10	3.217	54.423
		0.73	0.87	1.36	0.697	6.968	0.60	0.73	1.19	0.645	7.070

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram, using the litter as a unit of treatment.

b: Values in parentheses are no. of litters examined.

*: Differs from control, $p < 0.05$.

Table 23. Gross findings of pups in the preliminary reproduction toxicity study of MNP in rats

Item	Male				Female			
	Control	MNP (mg/kg)			Control	MNP (mg/kg)		
		30	100	300		30	100	300
No. of dead animals ^a	1	^b 2	^b 6	2	1	1	0	0
Abnormal findings	^c 0	0	0	0	0	0	^d -	-
No. of animals killed on day 4 of lactation	59	83	64	70	70	70	68	86
Skin of right thoracic and right abdominal region : Scab	0	0	1	0	0	0	0	0
Skin of right medial femoral region : Scab	0	0	0	0	0	0	1	0

a: Excludes missing.

b: Includes 1 pup of unknown sex.

c: Values are no. of animals with findings.

d: - = blank value.