試験番号 R-10-006

最終報告書訂正版

N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室　委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-E

TEL 0463-82-4751

目次

要約 5
試験目的 6

材料と方法 6
1. 被験物質 6
2. 動物および飼育方法 7
3. 投与検体 8
4. 投与量の設定および投与方法 8
5. 検査法 9
6. データの解析法 11

試験成績 12
1. 親動物 12
2. 生殖能力 16
3. 出生児 16
考察 17
参考文献 18

Table 27

要約

N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドの親動物に対する影響および生殖能力さらには出生児に及ぼす影響を検討するために、被験物質を 0(媒体:日局オリブ油)、40、100 および 250 mg/kg の用量で雌雄の Sprague-Dawley 系ラット(雌雄各 13 匹/群)に 10 週齢から 1 日 1 回、強制経口投与した。投与 15 日から 2 週間を限度として交配させ、雄動物は 42 日間投与した後に剖検した。雌動物は交配後、自然分娩させて哺育 4 日まで投与した後、出生児は哺育 4 日に、母動物は哺育 5 日に剖検した。その結果を以下に要約した。

1. 親動物所見

雄動物では、一般状態の異常は観察されなかった。雌動物では、周産期に死亡した例が 100 mg/kg 投与群に 1 例、250 mg/kg 投与群に 5 例認められた。雌の生存動物においても、分娩後に自発運動の低下した例が 250 mg/kg 投与群に 2 例観察された。250 mg/kg 投与群では、雌雄ともに体重の増加抑制がみられ、雌の摂餌量が低下した。250 mg/kg 投与群の肝臓重量は、雌雄とも増加傾向を示した。肝臓の病理組織学的検査では、250 mg/kg 投与群の雌雄で、グリソン鞘周囲に胆管の増生とびまん性にクッパー細胞の増生が観察された。十二指腸の病理組織学的検査では、250 mg/kg 投与群の雌雄に粘膜の肥厚が観察された。その他の病理学的所見、さらには精巣、精巣上体、前立腺、精嚢および卵巣の重量に被験物質投与の影響を示唆する変化はなかった。

2. 生殖能力所見

100 および 250 mg/kg 投与群では分娩状態の不良が観察され、出産率が低下した。250 mg/kg 投与群では、哺育 4 日までに全哺育児が死亡した母動物数が増加した。雌の性周期、雌雄の交尾率および受胎率、妊娠動物の黄体数、着床数、着床率および妊娠期間については、被験物質投与の影響は認めらなかった。

3. 出生児所見

生児出産率、出生率および新生児生存率が 250 mg/kg 投与群で低下した。性比、出生児の形態および体重に被験物質投与の影響は認められなかった。

4. 無毒性量(NOAEL)

本試験条件下では、体重の増加抑制と肝臓および十二指腸に病理組織学的な異常所見が 250 mg/kg 投与群の雌雄で観察されたことから、親動物に対する一般毒性学的無毒性量は 100 mg/kg/day、分娩状態の不良を伴う母動物の死亡が 100 mg/kg 以上の投与群で認められたことから、親動物の生殖能力に対する無毒性量は 40 mg/kg/day、出生児の生存率が 250 mg/kg 投与群で低下したことから、次世代に対する無毒性量は 100 mg/kg/day と判断した。

試験目的

雌雄ラットの交配前(2 週間)および交配期間中(最長 2 週間)ならびに雄動物では交配期間終了後 2 週間、雌動物では妊娠期間を通して周産期(哺育 4 日まで)に N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(略称:DCC)を経口投与し、雌雄ラットに対する影響および生殖能力さらには出生児に対する影響について検討した。

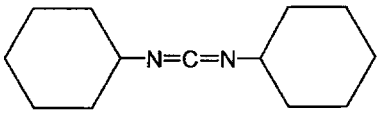
材料と方法

1. 被験物質

被験物質である N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide、CAS No.538-75-0、分子式: $C_{13}H_{22}N_2$、分子量:206.33、外観・性状:塊状、無色～白色、無臭、純度:99.1%、沸点:154～156℃/14.6hPa、融点:34.5℃、 Annex A)は

使用時まで冷蔵・遮光下(実測値 3～7℃)で保管した。被

験物質の構造式を以下に示す。



被験物質の安定性は、投与開始前(2010 年 8 月 30 日)および投与期間終了後(2010 年 12 月 10 日)に秦野研究所にて確認した(Annex B-1、Annex B-2)。測定法はAnnex B-3 に示す。

2. 動物および飼育方法

日本チャールス・リバー厚木飼育センターより 8 週齢の Sprague-Dawley(SD)系〔Crl:CD(SD)、SPF〕ラット雄 62 匹、雌 73 匹を購入し、12 号室に収容して、検疫と飼育環境への馴化を兼ね入荷日も含め 14 日間飼育した。検疫・馴化期間中は動物の尾にフェルトペンで馴化番号を標識し、飼育ケージに試験番号、性別および馴化番号を記入した動物カードを掛けた。1 日 1 回、動物の一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。また、雌動物については、入荷翌日から毎日、性周期を観察した。入荷動物の入荷時および検疫終了時の体重は下記の通りであった。

動物入荷日　:2010 年 9 月 1 日
入荷時体重　:雄 263.3～300.0 g、雌 180.5～212.3 g
検疫終了日　:2010 年 9 月 14 日
検疫終了時体重　:雄 354.0～436.0 g、雌 215.5～280.2 g

検疫・馴化の結果、入荷した全ての動物のうち、雄動物では一般状態の異常(被毛の汚れ)が 1 例(馴化番号:M00050)、体重推移の異常(体重増加抑制)が 1 例(馴化番号:M00062)認められ、群分けから除外した。雌動物では一般状態の異常(腹部の局所的膨隆)が 1 例(馴化番号:F00024)に認められた。この 1 例と、規則的な性周期の回帰が認められない 6 匹(馴化番号:F00001、F00011、F00046、F00048、F00067、F00071)を除外し、体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。群分けした動物には一連の動物番号を割り当て、フェルトペンで尾に個体を識別する番号を標識し、色彩の異なった動物カードに試験番号、性別、および動物番号を記入して飼育ケージに掛けた。群分けから棄却された雄動物 8 匹、雌動物 14 匹および一般状態、体重増加異常および性周期の結果により除外した雄動物 2 匹、雌動物 7 匹は全て余剰動物とし、安楽死させた。

動物は許容温度 21.0～25.0℃、許容湿度 40.0～75.0%、換気設定約 15 回/時間、明暗サイクル 12 時間(7 時～19 時)点灯、12 時間(19 時～7 時)消灯に設定された飼育室内で、金属製金網床ケージ(220w×270d×190h mm)に 1 匹ずつ(交配時は 2 匹)収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。雌動物は全例について、妊娠 18 日から哺育 4 日までラット用プラスチック製繁殖ケージ(350w×400d×180h mm)に 1 匹ずつ収容し、床敷として紙パルプ製チップ(ペパークリーン、日本エスエルシー)を適宜供給した。期間中、飼育環境の異常は認められず、動物室の温度の実測値は 23.5～24.0℃、湿度の実測値は 52.0～70.0%であった。また、供給した飼料、飲料水および床敷の分析結果は、いずれも標準操作手順書に記載の許容範囲内であることを確認した。

3. 投与検体

1)調製

40℃以下で加温して溶かした被験物質を秤量し、媒体を加えて溶解させ 5 w/v% 溶液を調製した。さらに 5 w/v% 溶液を媒体によって希釈し、2 ならびに 0.8 w/v% 液を調製した。調製した検体は冷蔵・遮光下で保管し(実測値 3～10℃、保管期間 2010 年 9 月 14 日～2010 年 10 月 30 日)、調製後 7 日以内に使用した。

2)安定性試験

秦野研究所で、投与に先立ち、5 w/v% および 0.8 w/v% の濃度の調製検体について、冷蔵、遮光条件下(実測値 4～5℃)における 3 および 8 日間の安定性を確認した後、本試験の投与を開始した(Annex C)。

3)含量の測定

本試験の初回調製検体について、被験物質含量を測定した。含量の判断基準は、平均含量が調製濃度の 90.0～110%、また各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0～110.0% 以内とした。2010 年 9 月 14 日に調製した各濃度の調製検体について含量を測定した結果、平均含量が調製指示濃度の 100.2～101.5% であり、各測定値のばらつきが平均値の 98.7～101.8% で規定範囲内にあったことを確認した(Annex D-1)。調製検体中の被験物質濃度測定法はAnnex D-2 に示す。

4. 投与量の設定および投与方法

投与経路は OECD 化学物質試験法ガイドラインに拠り、ラット用胃管による強制経口投与とした。

本試験の投与量は、本被験物質と同じ物質である N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドのラットを用いる 28 日間反復投与毒性試験 [1)]の結果をもとに設定した。すなわち、DCC を 15、100 および 500 mg/kg の用量で 28 日間反復経口投与した結果、500 mg/kg 投与群では雌雄ともに自発運動量の減少、体重増加抑制、肝臓重量の増加、十二指腸粘膜の肥厚などが観察され、雌 2 例が死亡していること、これらの変化は 100 mg/kg 以下の投与群では認められていないこと、また、7 日間反復経口投与した用量設定試験では、125 および 250 mg/kg 投与群においても自発運動量減少等の毒性徴候が観察されていることから、本試験の高用量群の投与量を 250 mg/kg に設定し、以下、公比 2.5 となるように中用量を 100 mg/kg、低用量を 40 mg/kg とした。

雌動物は交配前 2 週間、交配期間、妊娠期間を通して分娩後の哺育 4 日まで、交尾は確認されたが分娩が認められない雌は剖検前日(妊娠 25 日相当日)まで、雄動物は交配前 2 週間、交配期間を通して剖検前日まで(総投与回数 42 回)、1 日 1 回、1 週 7 回、9 時 5 分～11 時 59 分の間に投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、最新の測定日の体重を基に算出した。なお、対照群には媒体である日局オリブ油を同様に投与した。

本試験の群構成および動物番号を以下に示した。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 [%(w/v)]	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
					雄	雌
1	日局オリブ油	0	0	5	M01001～M01013	F01001～F01013
2	DCC	40	0.8	5	M02001～M02013	F02001～F02013
3	DCC	100	2	5	M03001～M03013	F03001～F03013
4	DCC	250	5	5	M04001～M04013	F04001～F04013

5. 検査法

1)親動物(F_0)

①一般状態の観察

全例について、投与期間中は投与前後の毎日 2 回、その他の飼育期間中は毎日 1 回、一般状態を観察した。

②体重測定

雄動物は、投与 1(投与開始日)、7、14、21、28、35、42 日および剖検日に体重を測定した。雌動物は投与 1、7、14 日、妊娠 0(交尾確認日)、7、14、20 日、哺育 0(分娩日)、4 日および剖検日に体重を測定した。死亡例は発見時に、全哺育児が死亡した母動物は、全哺育児が死亡した日に体重を測定した。

③摂餌量測定

雄動物は、投与 1～2、7～8、14～15、29～30、35～36、41～42 日に摂餌量を測定した。雌動物は投与 1～2、7～8、14～15 日および妊娠 0～1、7～8、14～15、20～21 日ならびに哺育 3～4 日に摂餌量を測定した。

④性周期観察

各群とも全例の雌動物について、群分け日までの性周期観察に引き続き投与開始以降も腟スメア標本を毎日作製して各動物の同居後、交尾が確認されるまで性周期を観察した。また、群ごとの平均発情回帰日数(個体ごとの発情期から発情期までの日数の平均)を算出した。

⑤交配

投与 15 日の 15 時 52 分から同群内の雌雄を 1 対 1 で連日同居させた。翌朝より毎朝、腟栓を確認し、同居中の雌の腟スメア標本を作製して鏡検した。腟内に腟栓あるいは腟スメア標本中に精子が確認された動物を交尾成立動物とし、この日を妊娠 0 日と起算して個別飼育に戻した。交配結果および妊娠の成否により、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数、交尾率〔(交尾動物数/交配に用いた動物数)×100, %〕、妊娠率〔(妊娠動物数/交尾した雌動物数)×100, %〕を算出した。なお、児を出産した動物あるいは子宮に着床痕の確認された動物を妊娠動物とした。

⑥妊娠・分娩・哺育状態の観察

交尾雌は全例を自然分娩させた。分娩の確認は、妊娠 21 日相当日から分娩が確認されるまで毎

日行い、午前 11 時までに分娩が完了した例についてその日を哺育 0 日(分娩日)とした。分娩状態の直接観察は、観察可能な動物について行い、直接観察できなかった動物についても、分娩後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。分娩後は、哺育状態を哺育 1～4 日の間、毎日観察した。分娩例の妊娠期間(妊娠 0 日から分娩日までの日数)を求め、各群の出産率[(生児出産雌数/妊娠動物数)×100, %]を算出した。

⑦剖検および病理組織学的検査

雄動物は、解剖前 18～24 時間絶食させた後、投与 42 日の翌日に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させて剖検し、肝臓、精巣、精巣上体の重量を測定した。精巣および精巣上体はブアン液に固定(長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液)、肝臓、十二指腸、前立腺、精嚢(凝固腺含む)、乳腺および肉眼的異常が認められた器官は 0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に固定し、肝臓、十二指腸、精巣、精巣上体について、病理組織学的検査を実施した。

雌動物は、解剖前 18～24 時間絶食させた後、分娩した雌は哺育 5 日に、交尾はしたが分娩しなかった雌は妊娠 26 日相当日に、それぞれペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させて剖検し、肝臓および卵巣重量を測定した。死亡例は、死亡確認日に分娩した雌のうち、全児が死亡した雌は全児が死亡した日に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させて剖検し、肝臓および卵巣重量を重量測定した。卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮については着床数を数え、着床率[(着床数/妊娠黄体数)×100, %]を算出した。未分娩であった雌は、10% 硫化アンモニウムで染色し、着床の有無を再確認した。通常の屠殺例は、肝臓、十二指腸、卵巣、子宮、膣、乳腺および肉眼的異常が認められた器官を 0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に固定し、肝臓、十二指腸、卵巣および病変部について、病理組織学的検査を実施した。死亡例および全児が死亡した母動物については、通常の屠殺例と同様の器官・組織に主要器官(肝臓、心臓、脳、腎臓、肺)を加え、病理組織学的に検査した。

2) 出生児(F_1)

①出生児の観察

哺育 0 日に生存児数および死亡児数を雌雄別に数えて、性別および外表奇形の有無を観察し、分娩率[(産児数/着床痕数)×100, %]、生児出産率[(出産生児数/着床痕数)×100, %]、および出生率[(出産生児数/産児数)×100, %]を算出した。また、哺育 1～4 日まで毎日、一般状態を観察し、生存児数と死亡児数を雌雄別に数え、新生児生存率[(哺育 4 日の生児数/哺育 0 日の生児数)×100, %]を算出した。生存児については、哺育 0 および 4 日に個別の体重を測定し、腹ごとに雌雄別の平均体重を算出するとともに、哺育 0 日および 4 日における性比[(雄生児数/総生児数)×100, %]を算出した。

②剖検

死亡児は外表奇形の有無を観察して剖検し、0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に固定して保存した。生存児は哺育 4 日にセボフルラン吸入麻酔下に放血致死させ剖検し、異常の認められた器官

は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定して保存した。

6. データの解析法

性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率ならびに出生児の形態異常頻度については、Fisher の直接確率検定を行った(有意水準:5%)。

被験物質投与群の病理組織学検査所見のうち、グレード分けした病理組織所見は、Mann-Whitney の U 検定により、また陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により、対照群との間の有意差検定を行った(有意水準:5%)。ただし、雌動物においては、哺育 5 日剖検例に関してのみ検定を実施した。

その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を1標本として、先ず、Bartlett の方法により各群の分散の一様性について検定(有意水準:5%)を行った。分散が一様であった場合には、一元配置型の分散分析(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められた場合は、Dunnett 法により多重比較を行った(有意水準:5%)。一方、いずれかの群で分散が 0 となった場合および分散が一様でなかった場合には、Kruskal-Wallis の順位検定(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った(有意水準:5%)。

試験成績

1. 親動物

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

雄動物では、投与期間中に一般状態の異常は観察されなかった。

雌動物では、周産期に死亡した例が 100 mg/kg 投与群に 1 例(動物番号:F03002)、250 mg/kg 投与群に 5 例(動物番号:F04001、F04004、F04006、F04008、F04009)認められたほか(下表参照)、分娩後に自発運動の低下した例が 250 mg/kg 投与群に 2 例(動物番号:F04002、F04012)観察された。その他の雌に異常は観察されなかった。

動物番号	死亡時期	剖検時の子宮内所見
F03002	分娩中	胎児 8 匹遺残
F04001	哺育 3 日	異常なし
F04004	妊娠 23 日	胎児 15 匹遺残
F04006	分娩中	胎児 2 匹遺残
F04008	分娩中	胎児 10 匹遺残
F04009	分娩中	胎児 1 匹遺残

2)体重 (Table 5～Table 12、Appendix 5-1～Appendix 12-4)

雄動物では、250 mg/kg 投与群で投与 1～7 日の体重増加量が対照群と比較して有意に低下したが、体重実測値には、DCC 各投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

雌動物では、250 mg/kg 投与群で妊娠 7、14 および 20 日の体重実側値が対照群と比較して有意に低下した。また、同群では、投与 7～14 日および妊娠 14～20 日の体重増加量が対照群と比較して有意に低下した。

雌雄とも、100 mg/kg 以下の DCC 投与群では、対照群との間に有意な差は認められなかった。

3)摂餌量(Table 13～Table 16、Appendix 13-1～Appendix 16-4)

雄動物では、投与期間中の摂餌量に DCC 各投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

雌動物では、250 mg/kg 投与群で妊娠 7、14 および 20 日の摂餌量が対照群と比較して有意に低下したが、100 mg/kg 以下の DCC 投与群では、対照群との間に有意な差は認められなかった。

4)器官重量(Table 17、Table 18、Appendix 17-1～Appendix 18-2-3)

雄動物では、250 mg/kg 投与群で解剖時の体重が対照群と比較して有意に低下し、肝臓の相対重量が対照群と比較して有意に増加した。雌動物でも同様の傾向がみられたが、有意差はなかった。精巣、精巣上体、前立腺(腹葉)、精嚢および卵巣の絶対重量および相対重量には、DCC 各投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

5)剖検所見(Table 19、Table 20、Appendix 19～Appendix 20)

解剖時期と各投与群の動物数を以下に示す。

対象動物	解剖時期	対照群 (オリブ油)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
雄動物	投与 42 日の翌日	13	13	13	13
分娩した雌動物	哺育 5 日	12	10	10	4
死亡した母動物	死亡確認日	0	0	1	5
全児が死亡した母動物	全児が死亡した日	1	2	1	3
未分娩雌(不妊例)	妊娠 26 日相当日	0	1	1	1

①雄動物

対照群、100 および 250 mg/kg 投与群の各 1 例では、両側の精巣に小型化が観察され、このうち対照群の 1 例は、両側の精巣上体も小型化していた。また、100 mg/kg 投与群の 1 例および 250 mg/kg 投与群の 2 例では、十二指腸の腸管壁の肥厚が観察された。さらに、100 および 250 mg/kg 投与群の各 1 例では、肝臓の大型化が観察され、このうち 100 mg/kg 投与群の例では、小葉構造が明瞭であった。

②雌動物

A.哺育 5 日剖検例

対照群の 1 例および 250 mg/kg 投与群の 2 例に、十二指腸の腸管壁の肥厚が観察された。また、100 および 250 mg/kg 投与群の各 1 例では、前胃粘膜が水腫様を呈し、肥厚していた。

B.死亡例

250 mg/kg 投与群の 1 例に、十二指腸の腸管壁の肥厚が観察された。また、肺では、250 mg/kg 投与群の 3 例に暗赤色化が、100 および 250 mg/kg 投与群の各 1 例に暗赤色域の散在がみられたほか、100 mg/kg 投与群で気腫が、250 mg/kg 投与群で退縮不全が各 1 例に観察された。さらに、脾臓では小型化が全例に認められ、250 mg/kg 投与群の 4 例では、腺胃粘膜に暗色点の散在あるいは陥凹部が観察されたほか、100 および 250 mg/kg 投与群の各 1 例では、口/鼻/会陰部周囲に被毛の汚れがみられた。膀胱では、250 mg/kg 投与群の 2 例に赤色尿の貯留が観察された。なお、妊娠中および分娩中に死亡した母動物では、子宮に胎児が遺残していた。

C.全児が死亡した例

40 mg/kg 投与群の 1 例および 250 mg/kg 投与群の 2 例では、十二指腸の腸管壁の肥厚が観察されたほか、対照群の 1 例には、粘膜の黄白色化がみられた。また、対照群および 40 mg/kg 投与群の各 1 例、250 mg/kg 投与群の 2 例では、肝臓の外側右葉、外側左葉、方形葉あるいは右葉に白色域が観察された。さらに、脾臓では、小型化が全例に認められ、対照群では腺胃粘膜に暗赤色点の散在が 1 例に、250 mg/kg 投与群では白色域および陥凹部が 1 例観察されたほか、対照群および 250 mg/kg 投与群の各 1 例では、口/鼻/会陰部周囲に被毛の汚れがみられた。

D.不妊例

肉眼的な異常所見は認められなかった。

6)病理組織学的検査(Table 21、Table 22、Appendix 21～Appendix 22)

①雄動物

精巣では、対照群および 100 mg/kg 投与群の各 2 例、40 および 250 mg/kg 投与群の各 1 例で、限局性の精細管萎縮が両側あるいは片側に観察され、そのうち 250 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号:M04003)では、間質のライディヒ細胞の過形成と精細管腔内の多核巨細胞が両側で観察された。対照群の 1 例では、精細管の生殖細胞層の減少が片側でみられた。

精巣上体では、精巣に異常が認められた例のうち、40 mg/kg 投与群の 1 例以外で管腔内の細胞残屑がみられ、そのうち対照群および 250 mg/kg 投与群の各 1 例では、精子数の減少も観察された。

肝臓では、250 mg/kg 投与群の 9 例でグリソン鞘周囲に胆管の増生が観察され、程度および頻度が対照群と比較して有意に増加した。また、同群の 6 例でびまん性にクッパー細胞の増生が観察され、頻度が対照群と比較して有意に増加した。さらに、250 mg/kg 投与群の 2 例に単細胞壊死が、1 例に肝細胞の分裂像が観察された。その他、対照群を含む各投与群で門脈周囲性に肝細胞の脂肪化ならびに小肉芽腫が観察されたが、DCC 各投与群と対照群との間に程度および頻度の差は認められなかった。

十二指腸では、250 mg/kg 投与群の全例に粘膜の肥厚が観察され、程度および頻度が対照群と比較して有意に増加した。

②雌動物

A.哺育 5 日剖検例

卵巣では、組織学的な異常所見は認められなかった。

肝臓では、250 mg/kg 投与群の 3 例でグリソン鞘周囲および小葉中間帯の肝細胞に変性/壊死が観察され、程度および頻度が対照群と比較して有意に増加した。これらの例では、グリソン鞘周囲に胆管の増生およびびまん性にクッパー細胞の増生がみられ、程度および頻度が対照群と比較して有意に増加した。このうち 1 例では肝細胞の単細胞壊死も認められた。その他、250 mg/kg 投与群以外の群で、門脈周囲性に肝細胞の脂肪化、小肉芽腫あるいは髄外造血がみられたが、対照群との間に程度および頻度の差は認められなかった。なお、漿膜下にみられた限局性の壊死巣は、対照群のみでみられた変化であった。

十二指腸では、250 mg/kg 投与群の全例に粘膜の肥厚が観察され、程度および頻度が対照群と比較して有意に増加した。

剖検時に異常所見が認められた胃では、100 および 250 mg/kg 投与群の各1例で前胃の粘膜固有層に水腫が観察された。

B.死亡例

卵巣では、組織学的な異常所見は認められなかった。

肝臓では、250 mg/kg 投与群の 2 例でグリソン鞘周囲および小葉中間帯に肝細胞の変性/壊死および散在する出血巣が認められた。また、100 mg/kg 投与群の 1 例および 250 mg/kg 投与群の全例には、びまん性にクッパー細胞の増生がみられたほか、このうち 250 mg/kg 投与群の 3 例でグリソン鞘周囲に胆管の増生が観察された。

腎臓では、全例で皮質の近位尿細管上皮の変性/壊死が認められたほか、遠位尿細管腔の拡張ならびに皮質/髄質に硝子円柱が観察された。これらの例のうち、250 mg/kg 投与群の 2 例では皮質の近位尿細管の細胞質に硝子滴がみられた。また、皮質の近位尿細管に細胞質の空胞化が全例で観察された。

肺では、100 mg/kg 投与群の 1 例、250 mg/kg 投与群の 3 例に水腫がみられたほか、250 mg/kg 投与群の 2 例では肺胞に泡沫細胞の集簇が観察された。

脾臓では、全例に赤脾髄/白脾髄領域の減少が認められた。また、全例に褐色色素の沈着、250 mg/kg 投与群の 1 例以外に髄外造血が観察された。

剖検時、異常所見が認められた胃では、250 mg/kg 投与群の 3 例で腺胃粘膜の潰瘍/びらんが観察されたが、赤色尿が認められた膀胱には、病理組織学的な異常所見は観察されなかった。なお、十二指腸では、いずれの例も粘膜が自己融解していたため、組織学的な評価が出来なかった。脳および心臓には、病理組織学的な異常所見は認められなかった。

C.全児が死亡した例

卵巣では、対照群の 1 例の片側に卵胞性嚢腫が観察されたが、DCC 各投与群に組織学的な異常所見は認められなかった。

肝臓では、250 mg/kg 投与群の 2 例でグリソン鞘周囲および小葉中間帯に肝細胞の変性/壊死、グリソン鞘周囲に胆管の増生、単細胞壊死が観察されたほか、他の 1 例を含む 250 mg/kg 投与群の 3 例でびまん性にクッパー細胞の増生がみられた。その他、小葉中間帯の肝細胞に細胞質の空胞化が全例で観察されたほか、250 mg/kg 投与群の 1 例では門脈周囲性に肝細胞の脂肪化がみられた。

十二指腸では、250 mg/kg 投与群で粘膜の肥厚あるいは腸絨毛の粘膜固有層にみられるリンパ球の減少が各 1 例に観察された。

腎臓では、全例に皮質の近位尿細管上皮の変性/壊死が認められたほか、遠位尿細管腔の拡張、皮質/髄質に硝子円柱ならびにが観察され、た。これらの例のうち、40 および 100 mg/kg 投与群の各 1 例で皮質に好塩基性尿細管が、他の 40 mg/kg 投与群の 1 例で漿膜下に限局性の線維化がみられた。また、全例で皮質の近位尿細管に細胞質の空胞化が観察された。

肺では、対照群、40 および 100 mg/kg 投与群の各 1 例、250 mg/kg 投与群の 2 例で肺胞に泡沫細胞の集簇が観察されたほか、40 mg/kg 投与群の 1 例で限局性の骨化生がみられた。

脾臓では、対照群を含む全例に赤脾髄/白脾髄領域の減少が認められた。また、全例に褐色色素の沈着、250 mg/kg 投与群の 1 例以外に髄外造血が観察された。

剖検時、異常所見が認められた胃では、対照群および 250 mg/kg 投与群の各 1 例で腺胃粘膜に潰瘍/びらんが観察され、このうち対照群の 1 例では、前胃の粘膜固有層に水腫を伴っていた。脳お

よび心臓には、病理組織学的な異常所見は認められなかった。

D.不妊例

卵巣、肝臓および十二指腸では、組織学的な異常所見は認められなかった。

2. 生殖能力

1)性周期および交配成績(Table 23、Table 24、Appendix 23-1～Appendix 24-4)

250 mg/kg 投与群では、投与開始前と投与開始後の平均発情回帰日数が対照群と比較して有意に延長した。また、同群では投与開始後に性周期の型が変化した動物の頻度が対照群と比較して有意に増加した。

各群とも全例で交尾が確認され、DCC 各投与群で不妊が 1 例(動物番号:F02012、F03006、F04011)認められたが、交尾率および受胎率に DCC 投与の影響は認められず、交尾までの日数およびその間の発情期の回数にも、対照群と DCC 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

2)黄体数、着床数および着床率(Table 25、Appendix 25-1～Appendix 25-4)

妊娠黄体数、着床数および着床率には、対照群と DCC 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

3)分娩および哺育状態(Table 25、Appendix 25-1～Appendix 25-4)

分娩直前あるいは分娩開始後に死亡した例が 100 および 250 mg/kg 投与群でみられ、出産率がそれぞれ 91.7% および 66.7% を示した。分娩状態が不良と判断された母動物は 100 mg/kg 投与群で 2 例(動物番号:F03002、F03007)、250 mg/kg 投与群で 5 例(動物番号:F04002、F04006、F04008、F04009、F04012)認められ、胎盤が児に繋がっている、児を集めない、ミルクスポットがないなどが観察された。哺育 4 日までに全哺育児が死亡した母動物は、対照群、および 100 mg/kg 投与群で各 1 例(動物番号:F01011、F03007)、40 mg/kg 投与群で 2 例(動物番号:F02001、F02005)、250 mg/kg 投与群で 3 例(動物番号:F04002、F04012、F04013)観察された。妊娠期間については、対照群と DCC 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

3. 出生児

1)生存性(Table 25、Appendix 25-1～Appendix 25-4)

250 mg/kg 投与群では、産児数および出産生児数が減少し、生児出産率および出生率が低下したが、対照群と比較して有意差は認められなかった。分娩率、新生児生存率および性比には、対照群と DCC 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

2)体重(Table 26、Appendix 26-1～Appendix 26-4)

哺育 0 および 4 日における出生児の体重には、対照群と DCC 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

3) 出生児観察(Table 27、Table 28、Appendix 27-1～Appendix 27-4)

250 mg/kg 投与群では、哺育 4 日の剖検において両側の腎盂拡張が雄 1 例(母動物番号: FC04005)に観察されたが、その他の出生児に異常は認められなかった。哺育 0 日における生存産児の外表観察および死亡児の剖検において、異常は観察されなかった。

考察

雌動物では、周産期に死亡した例が 100 および 250 mg/kg 投与群で認められたほか、分娩後に自発運動が低下した例も 250 mg/kg 投与群で観察された。また、分娩状態が不良と判断された母動物や全哺育児が死亡した母動物が 100 および 250 mg/kg 投与群で認められたことから、被験物質の 100 mg/kg 以上は、分娩および哺育に悪影響を及ぼすことが示唆された。28 日間反復投与毒性試験 [1]の 500 mg/kg 投与群でみられた死亡は肝障害によるものと推察されているが、今回の試験でみられた母動物の死亡は胎児の子宮内遺残が原因と考えられること、雄動物に一般状態の異常が観察されなかったことから、妊娠によって被験物質投与の毒性影響が増強されたものと推察される。

一般毒性学的影響としては、250 mg/kg 投与群の雌雄で体重の増加抑制がみられ、同群の雌では摂餌量の低下が観察された。さらに、250 mg/kg 投与群では、雌雄とも肝臓重量が増加し、肝臓の病理組織学的検査では、グリソン鞘周囲に胆管の増生とびまん性にクッパー細胞の増生が観察された。また、十二指腸の病理組織学的検査では、250 mg/kg 投与群の雌雄に粘膜の肥厚が観察された。ラットを用いる 28 日間反復投与毒性試験 [1] においても、肝臓と十二指腸に類似の異常所見が観察されていることから、これらの所見はいずれも被験物質投与により誘発されたものと考えられる。なお、対照群を含む 100 mg/kg 以下の投与群においても、剖検時に十二指腸の腸管壁の肥厚は観察されたが、病理組織学的検査では粘膜の肥厚は確認されなかった。

250 mg/kg 投与群で投与後の発情回帰日数が延長し、性周期の型が変化した動物数が増えた。しかし、同群の発情回帰日数は投与前から延長傾向にあったこと、交尾率、受胎率さらには交尾までの日数およびその間の発情期の回数に被験物質投与の影響が認められていないことから、250 mg/kg 投与群にみられた性周期の変化は、被験物質投与の影響ではないと判断した。

卵巣の重量および卵巣の病理組織学的検査では、被験物質投与の影響を示唆する変化は観察されなかった。また、妊娠黄体数、着床数、着床率および分娩率にも被験物質投与の影響が認められなかったことから、被験物質は、着床から胎児発育に対しても影響はないものと推定される。

哺育 4 日までに全哺育児が死亡した母動物は、対照群を含む全ての投与群で観察された。しかし、病理組織学的検査では、本被験物質により誘発されたと考えられる肝臓および十二指腸の異常所見が 250 mg/kg 投与群で認められた以外は、腎皮質における近位尿細管上皮の変性/壊死、遠位尿細管腔の拡張、脾臓における赤脾髄/白脾髄領域の減少などが全例に共通して観察されたのみであった。

精巣の病理組織学的検査では、250 mg/kg 投与群の 1 例に精細管の異常が観察され、精巣上体の精子数も減少した。しかし、同例の交尾相手雌では妊娠が確認されており、同様の異常所見は対照群の

動物にも観察されていることから、被験物質投与の影響ではないと判断した。さらに、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢の重量に被験物質投与の影響は認められなかった。類似物質のシクロヘキシルアミンについては、ラット精巣の精細管へ影響が報告 [2]されているが、本被験物質は、雄の生殖器系に悪影響を及ぼさないものと考えられる。

出生児への影響としては、250 mg/kg 投与群で生児出産率、出生率および新生児生存率が低下したが、これらの変化は被験物質の分娩への影響に起因した変化と推察された。また、性比および出生児体重には、被験物質投与の影響がみられていないことから、出生児への直接的な影響はほとんどないものと推察される。なお、哺育 4 日の剖検時に、腎盂拡張が 250 mg/kg 投与群の雄児 1 例に観察されたが、その他の出生児に同様の異常は認められず、死亡児の剖検でも異常が観察されなかったことから、被験物質の影響を示唆するものではないと判断した。

以上の結果から、本試験条件下では、体重の増加抑制と肝臓および十二指腸に病理組織学的な異常所見が 250 mg/kg 投与群の雌雄で観察されたことから、親動物に対する一般毒性学的無毒性量は 100 mg/kg/day、分娩状態の不良を伴う母動物の死亡が 100 mg/kg 以上の投与群で認められたことから、親動物の生殖能力に対する無毒性量は 40 mg/kg/day、出生児の生存率が 250 mg/kg 投与群で低下したことから、次世代に対する無毒性量は 100 mg/kg/day と判断した。

参考文献

1) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 監修:化学物質毒性試験報告 Vol.1, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.391-400(1994)

2) James, R.W., Heywood, R. and Crook, D. (1981) Testicular responses of rats and dogs to cyclohexylamine overdosage. Food Cosmet. Toxicol., 19, 291-296.

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 1. General conditions of male rats

| Group | Number of males and general conditions | Days of administration | | |

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 1 (continued). General conditions of male rats

Group	Number of males and general conditions	Days of administration																																			
		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39		40		41		42		43
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre
Olive oil (vehicle)	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
DCC 40 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
DCC 100 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
DCC 250 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 2. General conditions of female rats

Group	Number of females and general conditions	Days of administration																																					
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Olive oil (vehicle)	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	9	9	7	7	5	5	0	0
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	9	9	7	7	5	5	0	0
DCC 40 mg/kg	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	12	12	10	10	6	6	0	0
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	12	12	10	10	6	6	0	0
DCC 100 mg/kg	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	11	11	8	8	4	4	1	1
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	11	11	8	8	4	4	1	1
DCC 250 mg/kg	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	11	11	8	8	2	2	0	0
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	11	11	8	8	2	2	0	0

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 3. General conditions of dams during pregnancy

Group	Number of dams and general conditions	Days of pregnancy																									
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Olive oil (vehicle)	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
DCC 40 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
DCC 100 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
DCC 250 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Pre: Before administration, Post: after administration.

(Continued)

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 3 (continued). General conditions of dams during pregnancy

Group	Number of dams and general conditions	Days of pregnancy																			
		14		15		16		17		18		19		20		21		22		23	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Olive oil (vehicle)	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	6	6	0	0
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	6	6	0	0
	General appearance, Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DCC 40 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	3	0	0
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	3	0	0
	General appearance, Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DCC 100 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	1	0
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	0	0
	General appearance, Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
DCC 250 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	7	3	0
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	7	0	0
	General appearance, Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 4. General conditions of dams during lactation

Group	Number of dams and general conditions	Days of lactation										
		0		1		2		3		4		5
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre
Olive oil (vehicle)	Number of dams	13	13	13	13	13	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	12	12	12	12	12	12
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	General appearance, Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DCC 40 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	10	10	10	10	10	10
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	10	10	10	10	10	10
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	General appearance, Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DCC 100 mg/kg	Number of dams	11	11	11	11	11	10	10	10	10	10	10
	General appearance, No abnormality	11	11	11	11	11	10	10	10	10	10	10
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	General appearance, Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DCC 250 mg/kg	Number of dams	8	8	8	6	5	5	5	4	4	4	4
	General appearance, No abnormality	6	6	6	6	5	5	4	4	4	4	4
	Behavior, Decrease in locomotor activity	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	General appearance, Death	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 5. Body weights of male rats

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of males	13	13	13	13
Days of administration				
1	397.4 ± 15.0	402.5 ± 14.7	397.0 ± 10.8	400.3 ± 14.7
7	429.3 ± 19.5	427.2 ± 22.0	421.2 ± 14.8	420.7 ± 16.6
14	459.0 ± 24.9	455.4 ± 24.8	449.9 ± 20.0	445.0 ± 20.3
21	481.7 ± 24.1	479.8 ± 26.1	470.2 ± 22.0	460.9 ± 23.6
28	510.7 ± 26.4	502.4 ± 26.5	494.1 ± 24.1	485.5 ± 29.5
35	533.7 ± 30.6	526.6 ± 26.3	516.2 ± 28.0	506.9 ± 32.2
42	554.0 ± 31.8	547.2 ± 30.3	535.6 ± 31.0	525.5 ± 35.5

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 6. Body weight gain of male rats

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of males	13	13	13	13
Days of administration				
7	31.9 ± 8.5	24.7 ± 11.7	24.2 ± 5.8	20.4 ± 4.8 **
14	29.7 ± 9.2	28.2 ± 13.8	28.7 ± 7.7	24.3 ± 8.6
21	22.7 ± 8.8	24.4 ± 7.3	20.3 ± 5.6	15.9 ± 9.2
28	29.0 ± 8.5	22.5 ± 8.8	23.9 ± 6.7	24.6 ± 10.0
35	22.9 ± 7.4	24.3 ± 8.1	22.1 ± 6.2	21.4 ± 6.1
42	20.3 ± 5.3	20.6 ± 9.8	19.4 ± 7.8	18.6 ± 10.5

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 7. Body weights of female rats

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
1	247.3 ± 11.9	248.1 ± 9.4	246.1 ± 12.2	250.2 ± 11.6
7	258.6 ± 12.3	258.9 ± 10.3	259.7 ± 12.0	257.5 ± 13.9
14	270.9 ± 15.9	272.5 ± 13.9	266.1 ± 16.7	260.7 ± 16.2

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 8. Body weights of dams during pregnancy

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of dams	13	12	12	12
Days of pregnancy				
0	280.9 ± 12.6	279.7 ± 14.4	276.9 ± 19.4	267.5 ± 15.3
7	314.9 ± 17.1	309.7 ± 17.0	308.1 ± 21.4	293.9 ± 17.5 *
14	351.6 ± 17.8	342.1 ± 18.4	347.7 ± 25.8	326.4 ± 18.5 **
20	432.6 ± 25.8	415.0 ± 20.8	423.5 ± 30.0	392.3 ± 22.9 **

Each value shows mean ± S.D. (g).
Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 9. Body weights of dams during lactation

Group	Olive oil (vehicle)		DCC 40 mg/kg		DCC 100 mg/kg		DCC 250 mg/kg	
Number of dams	13		12		11		10	
Days of lactation								
0	323.8 ± 24.3		315.8 ± 34.0		307.7 ± 34.2		291.5 ± 36.1	
4	339.6 ± 26.7	(12)	335.3 ± 20.8	(10)	331.2 ± 26.9	(10)	325.2 ± 13.4	(4)

Each value shows mean ± S.D. (g).

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 10. Body weight gain of female rats

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
7	11.3 ± 6.1	10.8 ± 8.2	13.6 ± 6.4	7.3 ± 6.5
14	12.3 ± 5.8	13.6 ± 8.8	6.4 ± 10.1	3.2 ± 7.7 *

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 11. Body weight gain of dams during pregnancy

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of dams	13	12	12	12
Days of pregnancy				
0	10.0 ± 9.1	8.5 ± 7.1	10.1 ± 6.9	7.4 ± 7.6
7	34.1 ± 10.1	30.0 ± 5.6	31.2 ± 5.1	26.3 ± 7.1
14	36.6 ± 5.4	32.4 ± 4.1	39.6 ± 6.4	32.5 ± 6.5
20	81.1 ± 13.7	72.9 ± 6.9	75.9 ± 6.4	65.9 ± 15.3 **

Each value shows mean ± S.D. (g).

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 12. Body weight gain of dams during lactation

Group	Olive oil (vehicle)		DCC 40 mg/kg		DCC 100 mg/kg		DCC 250 mg/kg	
Number of dams	13		12		11		8	
Days of lactation								
0	-108.9 ± 28.5		-99.2 ± 18.0		-110.6 ± 22.8		-105.2 ± 29.1	
4	13.2 ± 16.7	(12)	10.7 ± 22.2	(10)	28.6 ± 9.3	(10)	20.4 ± 10.2	(4)

Each value shows mean ± S.D. (g).

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 13. Food consumption of male rats

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of males	13	13	13	13
Days of administration				
1	25.4 ± 3.1	26.6 ± 3.7	24.1 ± 2.5	23.8 ± 3.2
7	25.3 ± 3.1	23.4 ± 3.2	22.2 ± 3.6	23.0 ± 1.9
14	21.7 ± 3.2	22.8 ± 3.2	22.3 ± 2.1	20.9 ± 2.3
29	23.7 ± 3.5	23.4 ± 2.7	22.5 ± 2.3	23.9 ± 2.6
35	22.8 ± 4.0	22.7 ± 2.5	22.1 ± 1.7	23.4 ± 2.9
41	24.3 ± 2.8	23.8 ± 3.0	24.0 ± 1.8	25.0 ± 3.1

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 14. Food consumption of female rats

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
1	18.8 ± 2.5	17.7 ± 3.0	17.8 ± 2.2	15.9 ± 4.1
7	16.2 ± 2.3	17.8 ± 2.6	15.3 ± 3.3	14.8 ± 2.6
14	16.8 ± 3.0	16.0 ± 2.5	16.1 ± 2.9	15.8 ± 2.4

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 15. Food consumption of dams during pregnancy

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of dams	13	12	12	12
Days of pregnancy				
0	18.4 ± 1.9	17.8 ± 1.8	16.7 ± 3.0	19.3 ± 9.4
7	22.3 ± 3.7	20.2 ± 2.8	20.6 ± 3.2	18.7 ± 2.3 *
14	25.0 ± 3.5	22.4 ± 3.0	22.5 ± 3.5	21.6 ± 1.8 *
20	15.4 ± 4.1	14.9 ± 4.5	12.6 ± 3.7	9.4 ± 5.5 **

Each value shows mean ± S.D. (g).
Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 16. Food consumption of dams during lactation

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of dams	12	10	10	3
Days of lactation				
3	26.5 ± 8.9	33.9 ± 7.6	34.3 ± 6.8	35.2 ± 8.5

Each value shows mean ± S.D. (g).
Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 17. Organ weights of male rats

Group		Olive oil (vehicle)			DCC 40 mg/kg			DCC 100 mg/kg			DCC 250 mg/kg			
Number of males		13			13			13			13			
Body weight	(g)	528.4	±	33.5	521.6	±	28.4	507.6	±	28.9	491.7	±	33.8	*
Liver	(mg)	14917.5	±	1803.5	14677.0	±	1145.0	15266.9	±	2121.6	15699.2	±	1366.2	
	(mg/g)	28.160	±	2.004	28.149	±	1.780	29.991	±	2.914	31.930	±	1.807	**
Testes	(mg)	3257.5	±	563.1	3441.9	±	243.3	3293.5	±	419.8	3387.7	±	532.2	
	(mg/g)	6.209	±	1.230	6.618	±	0.603	6.512	±	0.912	6.922	±	1.228	
Epididymides	(mg)	1192.3	±	194.7	1301.6	±	102.0	1198.8	±	88.7	1266.9	±	158.8	
	(mg/g)	2.268	±	0.406	2.501	±	0.223	2.368	±	0.207	2.588	±	0.377	
Prostate, ventral	(mg)	626.5	±	101.8	637.6	±	162.5	638.5	±	130.1	650.3	±	104.6	
	(mg/g)	1.194	±	0.229	1.226	±	0.313	1.256	±	0.246	1.331	±	0.245	
Seminal vesicles	(mg)	1907.7	±	430.4	1669.7	±	338.9	1837.3	±	216.5	1752.7	±	126.9	
	(mg/g)	3.614	±	0.781	3.205	±	0.638	3.617	±	0.336	3.570	±	0.214	

Each value shows mean ± S.D.
Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 18. Organ weights of female rats

Group		Olive oil (vehicle)			DCC 40 mg/kg			DCC 100 mg/kg			DCC 250 mg/kg		
Number of females		12			10			10			4		
Body weight	(g)	307.7	±	25.5	306.0	±	20.4	297.5	±	23.7	289.6	±	20.6
Liver	(mg)	10146.4	±	740.0	10223.8	±	555.2	10309.7	±	711.5	10358.9	±	821.9
	(mg/g)	33.120	±	3.014	33.501	±	2.342	34.760	±	2.501	35.956	±	4.321
Ovaries	(mg)	105.5	±	9.7	102.9	±	11.6	109.0	±	12.9	97.6	±	9.8
	(mg/g)	0.344	±	0.039	0.336	±	0.032	0.367	±	0.044	0.338	±	0.033

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 19. Macroscopic findings of male rats

Group	DCC		DCC		DCC		DCC	
Dose(mg/kg)	0		40		100		250	
Findings / Grade	-	P	-	P	-	P	-	P
Testis								
Small, bilateral	12	1	13	0	12	1	12	1
Epididymis								
Small, bilateral	12	1	13	0	13	0	13	0
Duodenum								
Thickening, wall	13	0	13	0	12	1	11	2
Liver								
Accentuated lobular pattern	13	0	13	0	12	1	13	0
Enlargement	13	0	13	0	12	1	12	1

Notes) - : No abnormal changes P : Non-graded change

Numerals represent the number of animals.

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 20. Macroscopic findings of female rats

	Group	DCC		DCC		DCC		DCC	
	Dose(mg/kg)	0		40		100		250	
Findings	Grade	-	P	-	P	-	P	-	P
Duodenum									
Thickening, wall		11	1	10	0	10	0	2	2
Stomach									
Edematous,									
mucosa, forestomach		12	0	10	0	9	1	3	1
Thickening,									
mucosa, forestomach		12	0	10	0	9	1	3	1

Notes) - : No abnormal changes P : Non-graded change

Numerals represent the number of animals(Subjected to autopsy on day 5 of lactation).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 21. Histopathological findings of male rats

Group	DCC							DCC							DCC							DCC						
Dose(mg/kg)	0							40							100							250						
Findings / Grade	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE
Testis																												
Atrophy, seminiferous tubule, focal, unilateral/bilateral	11	1	1	0	0			12	1	0	0	0			11	1	1	0	0			12	0	1	0	0		
Decrease, germ cell layer, seminiferous tubule, unilateral	12	1	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0		
Hyperplasia, Leydig cell, interstitium, bilateral	13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			12	1	0	0	0		
Multinucleated giant cell, lumaen, seminiferous tubule, bilateral	13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			12	1	0	0	0		
Epididymis																												
Cell debris, lumen	10	2	1	0	0			13	0	0	0	0			11	2	0	0	0			12	0	1	0	0		
Decrease, sperm, lumen	12	0	1	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			12	0	1	0	0		
Liver																												
Fatty change, hepatocyte, periportal	1	10	2	0	0			0	10	3	0	0			1	9	3	0	0			0	13	0	0	0		
Microgranuloma	8	5	0	0	0			8	5	0	0	0			10	3	0	0	0			7	5	1	0	0		
Mitosis, hepatocyte	13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			12	1	0	0	0		
Proliferation, bile duct around Glisson's sheath	13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			4	9	0	0	0	**	##
Proliferation, Kupffer cell, diffuse	13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			7	6	0	0	0		##
Single cell necrosis	13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			11	2	0	0	0		
Duodenum																												
Thickening, mucosa	13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			0	6	7	0	0	**	##

Notes) - : No abnormal changes ±: Very slight + : Slight 2+: Moderate 3+: Marked

P : Non-graded change NE: Not examined

Numerals represent the number of animals.

**, P<0.01 : Significantly different from control (Two-tailed Mann-Whitney U test).

##, P<0.01 : Significantly different from control (One-tailed Fisher exact test).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 22. Histopathological findings of female rats

Group	DCC							DCC							DCC							DCC						
Dose(mg/kg)	0							40							100							250						
Findings / Grade	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE
Ovary	12							10							10							4						
Liver																												
Fatty change, hepatocyte, periportal	10	1	1	0	0			8	2	0	0	0			9	1	0	0	0			4	0	0	0	0		
Hematopoiesis, extramedullary	12	0	0	0	0			10	0	0	0	0			9	1	0	0	0			4	0	0	0	0		
Microgranuloma	9	3	0	0	0			6	4	0	0	0			5	5	0	0	0			4	0	0	0	0		
Necrosis, focal, subserosa	11	1	0	0	0			10	0	0	0	0			10	0	0	0	0			4	0	0	0	0		
Degeneration/necrosis, hepatocyte, around Glisson's sheath/midlobular	12	0	0	0	0			10	0	0	0	0			10	0	0	0	0			1	3	0	0	0	*	##
Proliferation, bile duct, around Glisson's sheath	12	0	0	0	0			10	0	0	0	0			10	0	0	0	0			1	3	0	0	0	*	##
Proliferation, Kupffer cell, diffuse	12	0	0	0	0			10	0	0	0	0			10	0	0	0	0			1	2	1	0	0	*	##
Single cell necrosis	12	0	0	0	0			10	0	0	0	0			10	0	0	0	0			3	1	0	0	0		
Duodenum																												
Thickening, mucosa	12	0	0	0	0			10	0	0	0	0			10	0	0	0	0			0	2	2	0	0	**	##
Stomach																												
Edema, lamina propria, forestomach															0	0	1	0	0			0	0	0	1	0		

Notes) - : No abnormal changes ±: Very slight + : Slight 2+: Moderate 3+: Marked

P : Non-graded change NE: Not examined

Numerals represent the number of animals.

**, P<0.01 : Significantly different from control (Two-tailed Mann-Whitney U test).

*, P<0.05 : Significantly different from control (Two-tailed Mann-Whitney U test).

##, P<0.01 : Significantly different from control (One-tailed Fisher exact test).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 23. Results of observations about estrous cycle

Dose (mg/kg)	Olive oil(vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of animals examined	13	13	13	13
Pre-treatment period				
Number of animals showing type of cycle				
4-day cycle	13	13	11	9
4/5-day cycle	0	0	0	2
5-day cycle	0	0	2	2
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D. (N)	4.0 ± 0.0 (13)	4.0 ± 0.0 (13)	4.2 ± 0.4 (13)	4.2 ± 0.4 (13) *
Treatment period				
Number of animals showing each type of cycle				
4-day cycle	13	11	8	6
4/5-day cycle	0	1	1	3
5-day cycle	0	1	4	4
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D. (N)	4.0 ± 0.0 (13)	4.1 ± 0.3 (13)	4.3 ± 0.5 (13)	4.4 ± 0.4 (13) **
Frequency of animals of which type of estrous cycle was changed after the treatment	0 / 13	2 / 13	3 / 13	6 / 13 **
Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean±S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (13)	1.0 ± 0.0 (13)	1.0 ± 0.0 (13)	1.0 ± 0.0 (12)

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 24. Results of observations about reproductive performance

Dose (mg/kg)	Olive oil(vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of mated pairs [A]	13	13	13	13
Number of copulated pairs [B]	13	13	13	13
Copulation index [(B/A)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile males [C]	13	12	12	12
Fertility index [(C/B)×100,%]	100.0	92.3	92.3	92.3
Pairing days until copulation ;Mean±S.D.(N)	2.6 ± 1.3 (13)	3.2 ± 1.0 (13)	2.8 ± 1.2 (13)	2.6 ± 1.0 (12)

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 25. Observation of offspring (F_1)

Group	Olive oil (vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Number of dams	13	12	11	8
Gestation length (days)				
Mean ± S.D. per dam	22.5 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5
Number of corpora lutea				
Total	216	187	202	193
Mean ± S.D. per dam	16.6 ± 2.3	15.6 ± 1.4	16.8 ± 1.8 (12)	16.1 ± 1.9 (12)
Number of implantation scars				
Total	198	173	190	175
Mean ± S.D. per dam	15.2 ± 2.0	14.4 ± 1.4	15.8 ± 1.9 (12)	14.6 ± 5.3 (12)
Implantation index (%) [a]	92.2 ± 8.7	92.7 ± 7.1	94.3 ± 7.6 (12)	90.7 ± 19.4 (12)
Gestation index (%) [b]	100.0	100.0	91.7	66.7
Number of offspring at birth				
Total	184	164	161	101
Mean ± S.D. per dam	14.2 ± 2.8	13.7 ± 1.4	14.6 ± 1.4	12.6 ± 4.3
Number of live offspring at birth				
Male	87	69	78	39
Female	92	90	73	39
Total	179	159	151	78
Mean ± S.D. per dam	13.8 ± 2.6	13.3 ± 1.4	13.7 ± 2.1	9.8 ± 5.7
Sex ratio [c]				
Mean ± S.D. per dam	0.49 ± 0.06	0.43 ± 0.10	0.51 ± 0.12	0.40 ± 0.28
Number of dead offspring				
Total	5	5	10	23
Mean ± S.D. per dam	0.4 ± 0.9	0.4 ± 0.7	1.9 ± 3.9	2.9 ± 4.5
Delivery index [d]				
Mean% ± S.D. per dam	92.1 ± 8.9	94.8 ± 5.5	95.3 ± 6.6	90.6 ± 12.4
Birth index [e]				
Mean% ± S.D. per dam	89.8 ± 9.5	92.0 ± 5.6	81.9 ± 28.3	72.2 ± 35.0
Live birth index [f]				
Mean% ± S.D. per dam	97.6 ± 5.4	97.1 ± 4.6	93.9 ± 12.1	77.6 ± 33.2
Number of offspring on day 4				
Male	78	58	72	28
Female	83	74	63	17
Sex ratio [c]				
Mean ± S.D. per dam	0.49 ± 0.06 (12)	0.44 ± 0.09 (10)	0.53 ± 0.11 (10)	0.62 ± 0.09 (4)
Viability index [g]				
Mean% ± S.D. per dam	90.9 ± 27.4	83.3 ± 38.9	86.2 ± 31.7	57.1 ± 53.5 (7)
Number of external abnormalities [i]	0	0	0	0
Mean% ± S.D. per dam	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).
a): (Number of implantation scars/Number of corpora lutea)×100.
b): (Number of dams with live offspring/number of pregnant dams)×100.
c): Number of male offspring/(number of male offspring + number of female offspring).
d): (Number of offspring at birth/Number of implantation scars)×100.
e): (Number of live offspring at birth/number of implantation scars)×100.
f): (Number of live offspring at birth/number of offspring at birth)×100.
g): (Number of live offspring 4 days after birth/number of live offspring at birth)×100.
h): (Number of live offspring 21 days after birth/number of live offspring after culling)×100.
i): Number of external abnormalities in live offspring at birth.
Figures in parentheses indicate number of dams.

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 26. Body weights of offspring (F_1)

Group	Olive oil (vehicle)		DCC 40 mg/kg		DCC 100 mg/kg		DCC 250 mg/kg	
Number of dams	13		12		11		6	
Male								
Days after birth								
0	6.7 ± 0.8		6.6 ± 0.5		6.4 ± 0.6		6.6 ± 1.3	
4	10.7 ± 2.6	(12)	10.6 ± 1.3	(10)	10.2 ± 1.4	(10)	11.5 ± 2.4	(4)
Number of dams	13		12		11		8	
Female								
Days after birth								
0	6.4 ± 0.7		6.2 ± 0.5		6.0 ± 0.5		6.2 ± 1.2	
4	10.3 ± 2.4	(12)	10.2 ± 1.2	(10)	9.7 ± 1.1	(10)	11.0 ± 2.4	(4)

Each value shows mean ± S.D. per dam. (g).
Figures in parentheses indicate number of dams.
Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 27. General conditions in offspring (F_1)

Group	Number of offspring and general conditions	Days after birth				
		0	1	2	3	4
Olive oil (vehicle)	Number of offspring	179	179	168	164	162
	General appearance, No abnormality	179	168	164	162	161
	General appearance, Death		11	4	2	1
DCC 40 mg/kg	Number of offspring	159	159	153	132	132
	General appearance, No abnormality	159	153	132	132	132
	General appearance, Death		6	21		
DCC 100 mg/kg	Number of offspring	151	151	137	136	136
	General appearance, No abnormality	151	137	136	136	135
	General appearance, Death		14	1		1
DCC 250 mg/kg	Number of offspring	78	78	63	49	45
	General appearance, No abnormality	78	63	49	45	45
	General appearance, Death		15	14	4	

Reproduction/developmental toxicity screening test of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide by oral administration in rats

Table 28. Morphological findings of offspring (F_1)

Dose	Olive oil(vehicle)	DCC 40 mg/kg	DCC 100 mg/kg	DCC 250 mg/kg
Dead offspring				
Number of dead offspring [a)]	23	32	26	56
Number of missing offspring	1	16	5	5
Number of dead offspring examined	22(15)[b)]	16(1)[b)]	21(11)[b)]	51(18)[b)]
Number of dead offspring with external changes	0	0	0	0
Number of dead offspring with visceral changes	0	0	0	0
Live offspring				
Number of live offspring examined (postnatal day 0)	179	159	151	78
Number of live offsping with external changes	0	0	0	0
Number of live offspring examined (postnatal day 4)	161	132	135	45
Number of live offspring with external changes	0	0	0	0
Number of live offspring with visceral changes	0	0	0	1
Dilatation of renal pelvis	0	0	0	1

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)
a) including missing offspring
b) parenthesis indicates the number of offspring not examined because of their autolysis