

最 終 報 告 書

試験名：ピグメントイエロー14のラットを用いた
経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：R-962

試験期間：2007年2月15日-2008年9月9日

試験施設

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

試験委託者

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

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

1. 目次

1. 目次	2
4. 要約	10
5. 緒言	11
6. 試験材料及び方法	12
6.1 被験物質及び媒体	12
6.1.1 被験物質	12
6.1.2 媒体	13
6.2 投与液の調製	13
6.2.1 対照物質（媒体）の調製及び保存方法	13
6.2.2 被験液の調製及び保存方法	13
6.2.3 被験液の安定性	13
6.2.4 被験液の濃度・均一性確認	14
6.3 試験動物種及び系統の選択理由	14
6.4 試験動物	14
6.5 飼育条件	15
6.6 動物の識別	15
6.7 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由	15
6.8 投与方法	16
6.9 投与量及び群構成	16
6.10 投与量の設定根拠	16
6.11 観察及び検査の方法	16
6.11.1 一般状態の観察	17

6.11.2	体重測定	17
6.11.3	摂餌量測定	17
6.11.4	腔垢検査	17
6.11.5	交配方法	17
6.11.6	分娩及び授乳観察	17
6.11.7	病理学検査	18
6.12	統計解析	19
7.	試験結果	21
7.1	一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1~16)	21
7.2	体重 (Fig. 1 及び 2、Table 2-1~2-4、Appendix 17~32)	21
7.3	摂餌量 (Fig. 3 及び 4、Table 3-1~3-4、Appendix 33~48)	21
7.4	器官重量 (Table 4、Appendix 49~52)	21
7.5	剖検所見 (Table 5、Appendix 53~148)	21
7.6	病理組織学検査 (Table 6、Appendix 53~148)	21
7.7	性周期 (Table 7、Appendix 149~152)	22
7.8	交配成績 (Table 8、Appendix 153~156)	22
7.9	分娩成績及び分娩・授乳状態 (Table 9、Appendix 157~160)	22
7.10	出生児の観察 (Table 10、Appendix 161~164)	22
7.11	出生児の生存率 (Table 11、Appendix 165~168)	22
7.12	出生児の体重 (Table 12、Appendix 169~172)	23
7.13	出生児の授乳 4 日剖検所見 (Table 13、Appendix 173~176)	23
8.	考察	24
9.	文献	25

図

Fig. 1	雄動物の体重
Fig. 2	雌動物の体重
Fig. 3	雄動物の摂餌量
Fig. 4	雌動物の摂餌量

表

Table 1-1	雄動物一般状態
Table 1-2	交配前投与期間の雌動物の一般状態
Table 1-3	妊娠期間の母動物の一般状態
Table 1-4	授乳期間の母動物の一般状態
Table 2-1	雄動物の体重
Table 2-2	交配前投与期間の雌動物の体重
Table 2-3	妊娠期間の母動物の体重
Table 2-4	授乳期間の母動物の体重
Table 3-1	雄動物の摂餌量
Table 3-2	交配前投与期間の雌動物の摂餌量
Table 3-3	妊娠期間の母動物の摂餌量
Table 3-4	授乳期間の母動物の摂餌量
Table 4	雄動物の器官重量
Table 5	剖検所見
Table 6	病理組織学検査
Table 7	性周期
Table 8	交配成績
Table 9	分娩成績
Table 10	出生児の観察
Table 11	出生児の生存率
Table 12	出生児の体重
Table 13	出生児の授乳 4 日剖検所見

4. 要約

ピグメントイエロー14の0（対照群：0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）、100、300及び1000 mg/kgを、Sprague-Dawley系SPFラットの雄には交配前14日間及び交配期間を通して剖検前日まで（42日間）、雌には交配前14日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳4日まで（41~53日間）投与し、反復投与毒性及び生殖発生毒性を検討した。

1. 反復投与毒性

いずれの投与群においても死亡動物はみられなかった。

一般状態では、300 mg/kg以上の投与群の雌雄において被験物質の排泄を反映した黄色便がみられた。雌雄の体重、摂餌量、剖検所見及び病理組織学検査には被験物質投与による影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には被験物質投与の影響は認められなかった。さらに、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数、出生率及び性比に被験物質投与の影響は認められず、授乳状態にも異常が認められないことから、1000 mg/kg投与群においても雌雄動物の交尾能、授精及び受胎能、母動物の妊娠維持、分娩及び哺育行動などの生殖機能への影響はないと考えられた。

出生児では、出生時及び授乳4日の雌雄体重、出生時の外表観察及び授乳4日剖検所見並びに生存率には被験物質投与による変化は認められなかった。

これらの結果から、ピグメントイエロー14の反復投与毒性に対する無影響量は雌雄ともに1000 mg/kg/day、生殖発生毒性に関しては、雌雄親動物及び児動物に対する無影響量はいずれも1000 mg/kg/dayと判断した。

R-962

5. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の委託により、ピグメントイエロー14のラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験を実施したので、その成績を報告する。

6. 試験材料及び方法

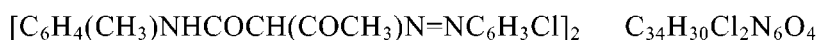
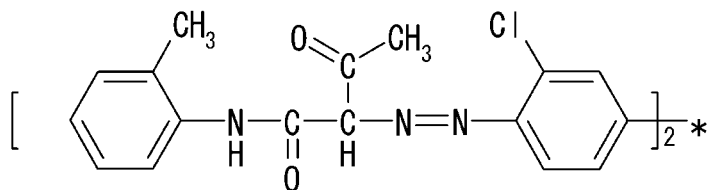
6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

ピグメントイエロー14 は
れた（添付資料 1）。

以下の情報とともに供給さ

名称	:	ピグメントイエロー14 2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[N-(2-methylphenyl)-3-oxobuthylamide]
CAS 番号	:	5468-75-7
構造式又は示性式	:	



分子量	:	657.56
純度	:	99.5%
性状	:	黄色粉末
密度	:	1.2 g/cm ³
融点	:	320-336°C
溶解性	:	水；不溶、メタノール及びブタノール；難溶
安定性	:	関連試験終了後に被験物質製造者で実施した特性分析の結果、投与期間中の被験物質の品質に問題がなく、安定であったことが確認された（添付資料 2）。
保存方法	:	冷暗所（冷蔵庫内、実測温度範囲：2~7°C）
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 2 研究棟 4 階 被験物質調製室
取扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。
残量の処置	:	被験物質 5g を保存試料として御殿場研究所 被験物質保存室に保存し、動物試験終了後の残量は全て被験物質製造者に返却し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した。また、分析用に小分けした被験物質の残量

は廃棄した。

6.1.2 媒体

名称 : 0.5 w/v%メチルセルロース水溶液
(略称: 0.5%MC 溶液)

1) 媒体構成物質 1

名称 : メトロース®SM-400
メーカー : 信越化学工業株式会社
ロット番号 : 411523
保存方法 : 室温
保存場所 : 御殿場研究所 第2研究棟被験物質調製室

2) 媒体構成物質 2

名称 : 注射用水
メーカー : 株式会社大塚製薬工場
規格 : 日本薬局方
ロット番号 : 6K76、6K90
保存方法 : 室温
保存場所 : 御殿場研究所 第2研究棟被験物質調製室

6.2 投与液の調製

6.2.1 対照物質（媒体）の調製及び保存方法

メトロース®SM-400 を注射用水に 0.5 w/v%になるように溶解し、0.5%MC溶液とした。対照物質（媒体）調製は各被験液調製日の前日あるいは当日に行い、使用時までガラス容器に入れ、冷所（冷蔵庫内、実測値：1~8℃）に保存した。

6.2.2 被験液の調製及び保存方法

濃度ごとに必要量の被験物質を秤量し、メノウ乳鉢及び乳棒を用いて媒体に懸濁して所定濃度（10、30 及び 100 mg/mL 濃度）とした。調製は 2007 年 3 月 1、2、5、8、12、15、22、28 日、4 月 2、5、10 及び 17 日の計 12 回行った。投与液（対照群液を含む）は 1 日使用分ずつ褐色ガラス瓶（遮光瓶）に分注後、冷暗所（冷蔵庫内、実測値：2~6℃）で保存し、調製後 7 日以内に投与に使用した。

6.2.3 被験液の安定性

本被験物質の 10 及び 100 mg/mL 懸濁液（媒体：0.5%MC 溶液）は、遮光容器で冷暗所（冷蔵庫内、許容値：1~10℃）8 日間保存後、室温 24 時間は安定であることが株式会社ボゾリサーチセンターで確認されている（添付資料 3、試験番号：A-2037）。

6.2.4 被験液の濃度・均一性確認

雄の投与第1週と雄の投与最終週に用いる各濃度の被験液について株式会社ボゾリサーチセンターで重量法により分析を実施した。その結果、各濃度液ともに表示値に対する被験物質の割合は95.1~106.0%、C.V.値は0.0~4.0%であり、いずれも許容範囲内（濃度：表示値に対する割合 $100 \pm 10\%$ 、C.V.: 10%以下）であった（添付資料4、5）。

[測定試料中濃度測定手順]

測定試料及び媒体の採取前に、使用する容量可変ピペットのチップ及びディスポーザブル試験管の風袋重量を測定した。測定試料を十分懸濁させた後にマグネチックスターラーで撹拌しながら、重さを測定しておいたチップを使用し、1.5 mL ずつ $n=1$ で採取し、ディスポーザブル試験管内にチップごと入れた。遠心濃縮機により乾固後、風袋重量を測定した。また、媒体を1.5 mL ずつ $n=3$ で採取し、同様の操作で乾固後の風袋重量を測定した。これらの重量を用いて、以下の式により測定試料中ピグメントイエロー14 測定濃度 (mg/mL) を算出した。

媒体（測定試料中の媒体）重量 (g) = $W_v - W_{vt}$

測定試料中ピグメントイエロー14 重量 (g)

= $W_s - W_{st} - \{\text{測定試料中の媒体重量の平均値 (g)}\}$

測定試料中ピグメントイエロー14 測定濃度 (mg/mL)

= $\{\text{測定試料中ピグメントイエロー14 重量 (g)} \times 1000\} / \text{測定試料採取量 (1.5 mL)}$

W_{vt} : 媒体採取前の風袋（チップ及びディスポーザブル試験管）重量 (g)

W_v : 媒体の乾固後の風袋重量 (g)

W_{st} : 測定試料採取前の風袋（チップ及びディスポーザブル試験管）重量 (g)

W_s : 測定試料の乾固後の風袋重量 (g)

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

動物種は毒性試験法ガイドラインに従いラットを選択し、またこの試験に使用された系統のラットは一般毒性試験、生殖・発生毒性試験に広く用いられ、その特性がよく知られており、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット〔CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター〕雌雄各 60 匹を 8 週齢で購入（入荷匹数：雌雄各 62 匹）し、11 日間の検疫・馴化飼育を行った。その間、一般状態の観察、体重測定及び性周期検査（検疫期間終了後の 7 日間）を行い、雄は一般状態、雌は一般状態及び性周期にそれぞれ異常がなく、体重増加が良好な 48 匹を選択し、9 週齢で投与に使用した。投与開始時の体重範囲は雄で 330~395g、雌は 220~258g であった。

なお、群分けは群分け当日（投与開始の前日）の体重により層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるように行った。個体の割り付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組み合わせ（ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割り当てた）で行った。群分けから除外された動物のうち、性周期に異常のない雌は無処置動物として 10 匹を継続飼育した。残りの雄（14 匹）及び性周期異常雌（4 匹）はエーテル深麻酔下で安楽死させた。なお、交配成績に被験物質投与の影響が認められなかったため、継続飼育した無処置雌動物 10 匹は、交配期間終了後、エーテル深麻酔下で安楽死させた。

6.5 飼育条件

動物は、温度 22~26°C、相対湿度 36~56%、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間（07:00~19:00）の動物飼育室（飼育室番号：908 号室）でブラケット式金属製網ケージ（W 254×D 350×H 170 mm：リードエンジニアリング株式会社）で個別に、交配中は雌雄各 1 匹の計 2 匹を収容した。なお、妊娠 17 日から授乳 5 日までは、床敷（ホワイトフレック：日本チャールス・リバー株式会社）を入れたプラスチック製エコンケージ（W 340×D 400×H 185 mm：日本クレア株式会社）に個別に収容した。飼料は NMF 固形（放射線滅菌：オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：061114、061214）をステンレス製給餌器により自由に摂取させた。飲料水は御殿場市営水道水を自動給水装置又は給水瓶により自由に摂取させた。

飼料中の混入物質等については使用したロットについて、財団法人日本食品分析センターで実施した分析結果を入手し、床敷については、財団法人日本食品分析センターで定期的（年 6 回）に実施した分析結果を入手した。飲料水については、水道法に準拠した水質の分析を東芝機械環境センター株式会社に定期的（年 4 回）に依頼し、結果を入手した。これらのデータにより飼料、飲料水及び床敷中の混入物質が試験成績に影響を与える可能性のないことを確認し、分析報告書の写しを保存した。

6.6 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に小動物用耳標をつけて行った。群分け後は、飼育ケージに群ごとに色分けしたケージラベルを付け、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、剖検予定日（雄）、交尾成立日及び分娩日（雌）を明記した。

6.7 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421 に準じ、経口投与を選択した。投与期間は、雄で交配前 14 日間、交配期間 14 日間及び交配期間終了後 14 日間の 42 日間、雌で交配前 14 日間、交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日までの 41~53 日間、不妊であった動物（動物番号：3111）については 41 日間とした。

6.8 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与に際して一般的な強制経口投与とした。投与容量は10 mL/kg 体重とし、フレキシブル胃ゾンデを用いて強制経口投与した(09:18~12:07、ただし、投与時に分娩中であった動物は、分娩終了後の 17:05~17:18 に行った)。対照群には媒体(0.5%MC 溶液)を同様に投与した。個体ごとの投与液量は最新の体重を基準に算出した。なお、雌の妊娠 7 日以降について、妊娠期間中は妊娠 7 日の体重を基準に算出した。

6.9 投与量及び群構成

投与量は 100、300 及び 1000 mg/kg の 3 用量とし、これに対照群を加え 4 群構成とした。1 群当たりの動物数は雌雄各 12 匹とした。群構成表を表 6-1.に示した。

表 6-1.群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	被験液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対 照 群	0	0	10	雄	12	1001~1012
				雌	12	1101~1112
低用量群	100	10	10	雄	12	2001~2012
				雌	12	2101~2112
中用量群	300	30	10	雄	12	3001~3012
				雌	12	3101~3112
高用量群	1000	100	10	雄	12	4001~4012
				雌	12	4101~4112

6.10 投与量の設定根拠

先に実施した「ピグメントイエロー14 のラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験(予備試験)」(投与量: 100、300 及び 1000 mg/kg、株式会社ボゾリサーチセンター試験番号: C-R071)では、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421 で投与限量とされている 1000 mg/kgにおいて、毒性変化は認められなかった¹⁾。したがって、簡易生殖毒性試験における投与量は 1000mg/kgを高用量とし、以下公比約 3 で除して 300 及び 100mg/kgの 3 用量を設定した。

6.11 観察及び検査の方法

試験日の起算は下記の通りとした。

投与開始日 : 投与 1 日
 交尾成立日 : 妊娠 0 日
 分娩終了日 : 授乳 0 日

6.11.1 一般状態の観察

全個体について、投与期間中は毎日3回（投与前、投与直後及び投与約2時間後）、それぞれ体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察した。

6.11.2 体重測定

雄は投与1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、42及び剖検日に、雌は投与1、4、8、11、15日（未交尾動物は投与18、22及び25日にも測定）、妊娠0、4、7、11、14、17及び20日並びに授乳0及び4日に体重を測定した。なお、午後の分娩観察時に分娩の終了が確認された個体の授乳0日の体重測定（15:04~16:59）を除き08:47~10:53の間に行った。

6.11.3 摂餌量測定

全個体について、雄は投与1、4、8、11、15、32、36、39及び42日に、雌は投与1、4、8、11及び15日、妊娠1、4、7、11、14、17及び20日並びに授乳2及び4日に残餌量を測定し、前日の給餌量から1匹当たりの1日摂餌量を算出した。給餌量及び残餌量の測定は08:33~11:55の間に行った。

6.11.4 膣垢検査

雌の全個体について、投与開始翌日から交尾が認められるまで毎日膣垢を採取し、検鏡した。交配前投与期間中は膣垢像を発情前期、発情期、発情後期及び発情休止期に分類し、発情期像発現回数及び発情期から次の発情期までの日数（性周期）を調べた。交配期間中は膣垢中の精子の有無を調べた。

6.11.5 交配方法

交配前投与期間終了後、同一投与群の雌雄を1:1で終夜同居させ、翌朝、膣栓形成あるいは膣垢中に精子を確認したものを交尾成立とみなした。交尾までに要した日数は交配開始日を0日と起算した。

6.11.6 分娩及び授乳観察

1) 母動物の観察

交尾確認雌動物は全例自然分娩させ、分娩状態の異常の有無を観察した。分娩終了の確認は妊娠21日から妊娠24日の間の1日2回（午前、午後）及び妊娠25日の午前まで行い、妊娠期間を0.5日単位で算出した。分娩が17:00までに終了していた場合、その日を授乳0日とした。妊娠25日の午前10時までには分娩しなかった300 mg/kg投与群の1例（動物番号：3111）は、エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させた後剖検を行い、妊娠の有無を確認した。その結果、着床が認められないことから、不妊と判断し、妊娠期間中のデータは統計処理から除外した。分娩が終了した母動物は出生児の胎盤及び羊膜の処理等の母性行動の有無を観察し、分娩終了日を授乳0日

とし、授乳 4 日まで出生児を授乳させ、児集め、営巣及び授乳を指標として授乳状態を観察した。

分娩した母動物は授乳 5 日に、エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、黄体数及び着床痕数を数えた。

2) 出生児の観察

出生日に出生児数、死産児数を数えた。出生児は外表異常の有無を観察し、性別を判定して体重を測定した後、母動物に授乳させた。出生児は生死の観察を授乳 4 日まで毎日 1 回行った。なお、死亡児は廃棄した。

授乳 4 日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で放血致死させて剖検を行い、頭部・胸部・腹部を含む器官・組織の異常の有無を調べた。なお、出生児の体重は個体別に体重を測定し、各腹単位で雌雄別に平均値を算出した。

また、1000mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：4112）において、給水瓶不良による水漏れによって、出生児 15 匹中 14 匹が授乳 4 日に死亡した。この母動物の、授乳 3 日までの哺育状態及び出生児の生存性に異常は認められなかったことから、明らかに事故死であるため、当該母動物の授乳 4 日出生児生存性のデータは評価より除外した。

6.11.7 病理学検査

1) 剖検及び器官重量測定

全ての生存動物について、最終投与翌日に、エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させた後に、それぞれ体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。なお、雌動物（母動物）は授乳 5 日に黄体数及び着床痕数を数えた。全例の精巣及び精巣上体の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重 100g 当たりの相対重量を算出した。なお、精巣及び精巣上体は左右別々に測定し、その合計値で評価した。

2) 病理組織学検査

全動物について、以下に示す器官・組織をリン酸緩衝 10vol%ホルマリン液で固定、保存した（ただし、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後リン酸緩衝 10vol%ホルマリン液で保存した）。次いで、パラフィン包埋後、切片とし、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色を行い、このうち対照群及び高用量群の動物の精巣、精巣上体、卵巣及び肉眼的異常部位について検索した（両側性の器官については両側を摘出し、片側を検索）。なお、中間用量群にみられた肉眼的異常部位についても同様に検索した。下線を施した器官・組織は固定・保存のみとした。

精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮、膣、肉眼的異常部位、個体識別部（耳介）

6.12 統計解析

- 1) 以下の式により各パラメータを算出した。

交尾率(%)= (交尾動物数/同居動物数) ×100

受胎率(%)= (妊娠した雌の数/交尾した雌の数) ×100

授精率(%)= (雌を妊娠させた雄の数/交尾した雄の数) ×100

出産率(%)= (出生児出産雌数/妊娠雌数) ×100

着床率(%)= (着床痕数/黄体数) ×100

死産児率(%)= (死産児数/総出産児数) ×100

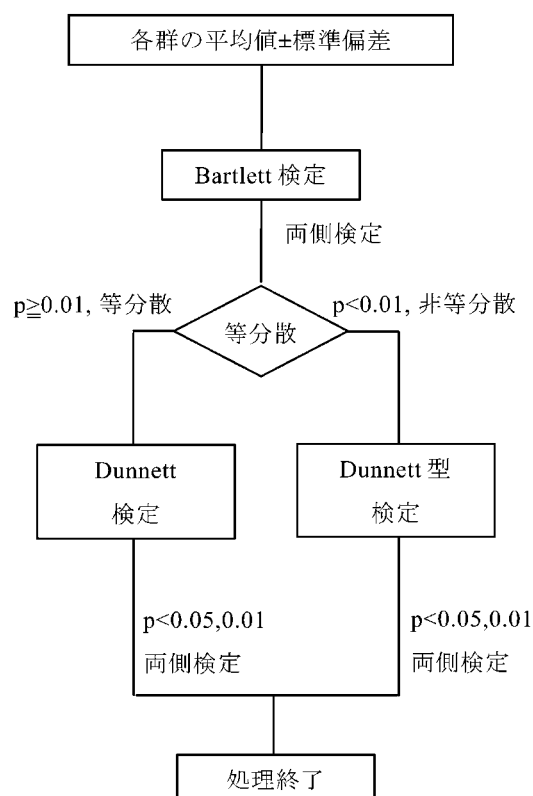
出生率(%)= (出生児数/総出産児数) ×100

外表異常率(%)= (外表異常児数/出生児数) ×100

性比=雄数/ (雄数+雌数)

出生児生存率(%)= (授乳4日生存児数/授乳0日出生児数) ×100

- 2) 体重、摂餌量、発情期像発現回数、性周期、交尾までに要した日数、妊娠期間、黄体数、着床痕数、生存児数及び器官重量は次に示す模式図の方法に従って検定した。なお、出生児体重（雌雄別）については、母動物ごとの平均値を求めた後、検定を行った^{2), 3)}。



- 3) 着床率、死産児率、出生率、外表異常率、出生児生存率は動物ごとに率を求めた後、Bartlett検定により等分散性を検定し（有意水準 0.01、両側）、等分散の場合

はDunnett検定、非等分散の場合はDunnett型検定を行った（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）^{2), 3)}。

- 4) 交尾率、授精率、受胎率、出産率、出生児の性比は、各群の交尾動物数、雌を妊娠させた雄動物数、妊娠雌動物数、出生児出産雌動物数、雄生存児数、雌生存児数の合計を求め、イエーツの連続修正による χ^2 検定を行った（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）。ただし、期待度数が 5 以下のセルがみられる場合にはFisherの直接確率計算法により検定を行った（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）。

7. 試験結果

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

いずれの投与群においても死亡動物はみられなかった。黄色便が 300mg/kg 以上の投与群の雌雄全例において、投与開始翌日より投与期間を通じてみられた。

7.2 体重 (Fig. 1 及び 2、Table 2-1~2-4、Appendix 17~32)

雌雄の体重は、いずれの投与群においても投与期間を通じて対照群と同等値を示し、有意差は認められなかった。

7.3 摂餌量 (Fig. 3 及び 4、Table 3-1~3-4、Appendix 33~48)

雌雄の摂餌量には被験物質投与による影響は認められなかった。

なお、100 mg/kg 投与群の雌で妊娠 4 日に有意な低値が、300 mg/kg 投与群の雌で授乳 2 日に有意な高値がみられたが、用量に関連しない一過性の変化であった。

7.4 器官重量 (Table 4、Appendix 49~52)

1000mg/kg 投与群で精巣の絶対重量の有意な高値が認められた。

その他の投与群では精巣及び精巣上体の絶対及び相対重量の双方において明らかな変化はみられなかった。

7.5 剖検所見 (Table 5、Appendix 53~148)

いずれの投与群の雌雄においても被験物質投与によると考えられる変化はみられなかった。

他に、以下の器官・組織に所見がみられたが、出現頻度及び病理学的性状から偶発性変化と考えられた。

肝臓	:	横隔膜ヘルニア結節が対照群で雄 1 例にみられた。
精巣	:	小型化が 300 mg/kg 投与群で 1 例にみられた。
膀胱	:	壁肥厚及び鉍質沈着が 100 mg/kg 投与群で雌 1 例にみられた。
子宮	:	ポリープが対照群で 1 例にみられた。

7.6 病理組織学検査 (Table 6、Appendix 53~148)

いずれの投与群の雌雄の器官・組織においても被験物質投与の影響と考えられる変化はみられなかった。

なお、以下に示す種々の器官・組織での所見は、その発生状況及び組織学的特徴から偶発性変化と考えられた。また、剖検所見において対照群の 1 例にみられた子宮のポリープは組織学的には胎盤の遺残であった。

精巣上体	:	軽微な精子肉芽腫が 1000 mg/kg 投与群で 1 例に、軽微
------	---	-----------------------------------

		な精子低形成及び軽微な管腔内の細胞残屑の増加が対照群で 1 例にみられた。
精巣	:	軽微な精細管の萎縮が 1000 mg/kg 投与群の 1 例に、軽度な精細管の萎縮が対照群の 1 例に、高度な精細管の萎縮が 300 mg/kg 投与群の 1 例にみられた。
肝臓	:	軽微な横隔膜結節が対照群の雄 1 例にみられた。
膀胱	:	軽度な結石とそれに伴う中等度な移行上皮のびまん性過形成が 100 mg/kg 投与群で雌 1 例にみられた。
子宮	:	軽度な胎盤の遺残が対照群の 1 例にみられた。

7.7 性周期 (Table 7、Appendix 149~152)

いずれの動物にも性周期の異常はみられなかった。また、発情期像発現回数及び平均性周期日数には対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

7.8 交配成績 (Table 8、Appendix 153~156)

ほとんどの組み合わせで、交配開始後 4 日までに交尾が成立した。不妊であった組み合わせは 300 mg/kg 投与群の 1 組のみであり、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

7.9 分娩成績及び分娩・授乳状態 (Table 9、Appendix 157~160)

分娩状態では、妊娠 21.5~23 日に全例が正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率には有意差は認められなかった。

授乳状態では、いずれの母動物にも児集め、営巣及び授乳行動に異常はみられなかった。なお、1000mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：4112）において、給水瓶不良による水漏れによって、出生児 15 匹中 14 匹が授乳 4 日に死亡した。

7.10 出生児の観察 (Table 10、Appendix 161~164)

出生児数、性比及び出生時体重には対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

また、いずれの投与群の出生児の外表観察においても異常はみられなかった。

7.11 出生児の生存率 (Table 11、Appendix 165~168)

授乳期間中の死亡児は対照群で 12 例、100 mg/kg 投与群で 4 例、300 mg/kg 投与群で 1 例及び 1000 mg/kg 投与群で 1 例みられ、300 及び 1000 mg/kg 投与群で授乳 4 日生存率に有意な高値が認められた。本変化は、生存性が良好であったことによるものであり、毒性学的意義はない。なお、1000mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：4112）において、出生児 15 匹中 14 匹が事故により授乳 4 日に死亡したため、当該母動物の授乳 4 日出生児生存性のデータは評価より除外した。

R-962

7.12 出生児の体重 (Table 12、Appendix 169~172)

出生時及び授乳 4 日の雌雄体重には対照群と各投与群との間に有意差はみられなかった。

7.13 出生児の授乳 4 日剖検所見 (Table 13、Appendix 173~176)

胸腺の頸部残留が対照群の雄 2 例及び 100 mg/kg 投与群の雌 2 例にみられたが、小数例で用量に関連しない変化であり、偶発性の変化と考えられた。

8. 考察

ピグメントイエロー14の0（対照群：0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）、100、300及び1000 mg/kgを、Sprague-Dawley系SPFラットの雄には交配前14日間及び交配期間を通して剖検前日まで（42日間）、雌には交配前14日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳4日まで（41~53日間）投与し、反復投与毒性及び生殖発生毒性を検討した。

1. 反復投与毒性

いずれの投与群においても死亡動物はみられなかった。

一般状態では、300 mg/kg以上の投与群の雌雄において黄色便がみられたが、被験物質の排泄に基づく変化と考えられ、生理学的な現象と判断した。

雌雄の体重及び摂餌量には被験物質投与による影響は認められなかった。

1000mg/kg投与群で精巢の絶対重量の高値がみられたが、相対重量に有意差はなく、組織学的異常がみられないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。

病理学検査では、雌雄の剖検所見及び病理組織学検査に被験物質投与による影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

親動物では、性周期、交尾までに要した日数、交尾率、受胎率及び授精率には被験物質投与の影響は認められなかった。さらに、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数、出生率及び性比に被験物質投与の影響は認められず、授乳状態にも異常が認められないことから、1000 mg/kg投与群においても雌雄動物の交尾能、授精及び受胎能、母動物の妊娠維持、分娩及び哺育行動などの生殖機能への影響はないと考えられた。

出生児では、出生時及び授乳4日の雌雄体重、出生時の外表観察及び授乳4日剖検所見並びに生存率には被験物質投与による変化は認められなかった。

これらの結果から、ピグメントイエロー14の反復投与毒性に対する無影響量は雌雄ともに1000 mg/kg/day、生殖発生毒性に関しては、雌雄親動物及び児動物に対する無影響量はいずれも1000 mg/kg/dayと判断した。

R-962

9. 文献

- 1) ピグメントイエロー14 のラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（予備試験）（株式会社ボゾリサーチセンター試験番号：C-R071）
- 2) Shayne C. Gad and Carrol S. Weil (1994) : Chapter 7. Statistics for Toxicologists, In Principles and Methods of Toxicology (A. Wallace Hayes, ed.), 3rd ed., pp.221-274, Raven Press, Ltd., New York.
- 3) 佐久間昭(1981)：薬効評価-計画と分析-II, pp.23-27, 387-389, 東京大学出版会, 東京.

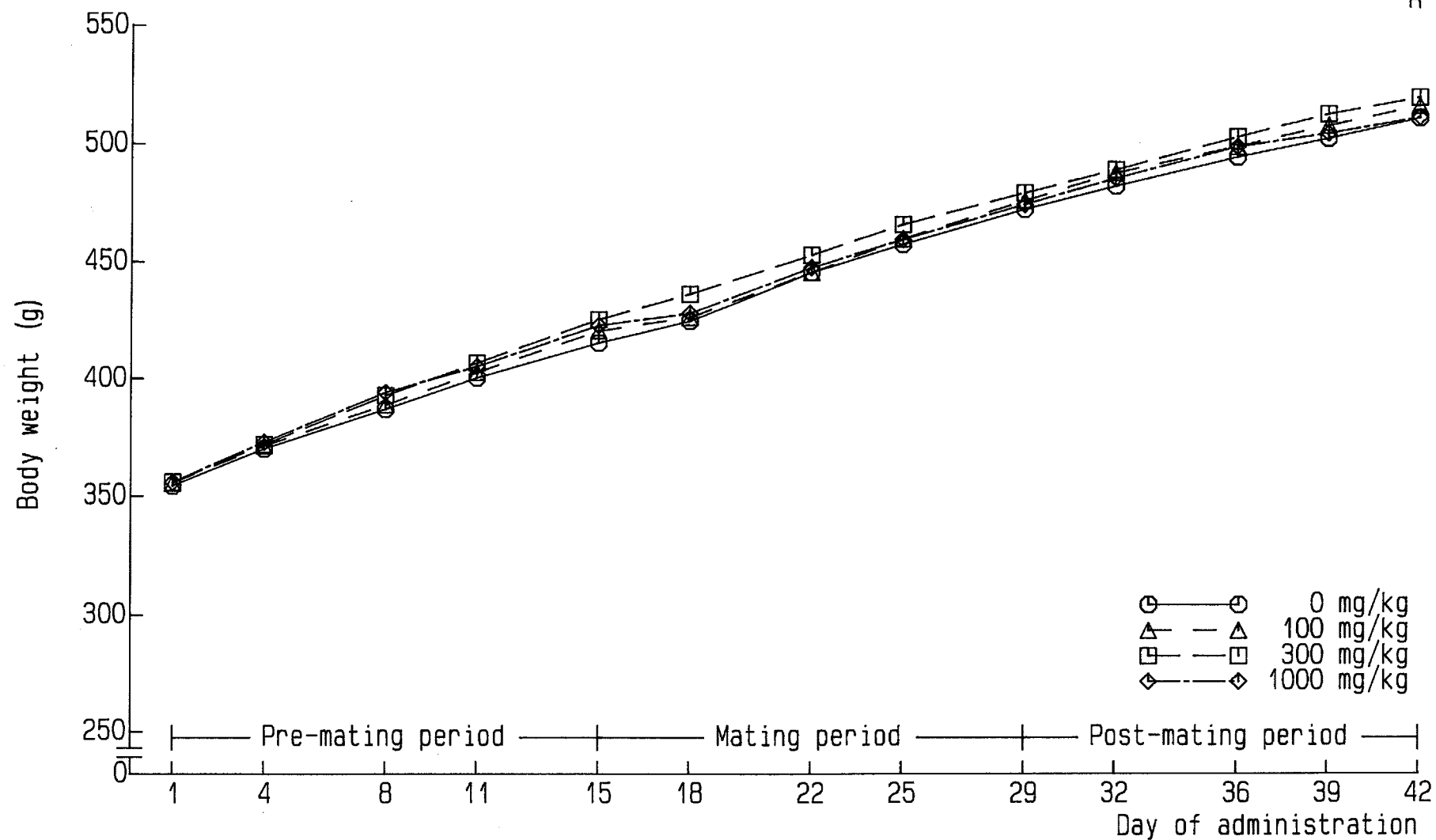


Fig.1 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration
Body weight changes of male rats

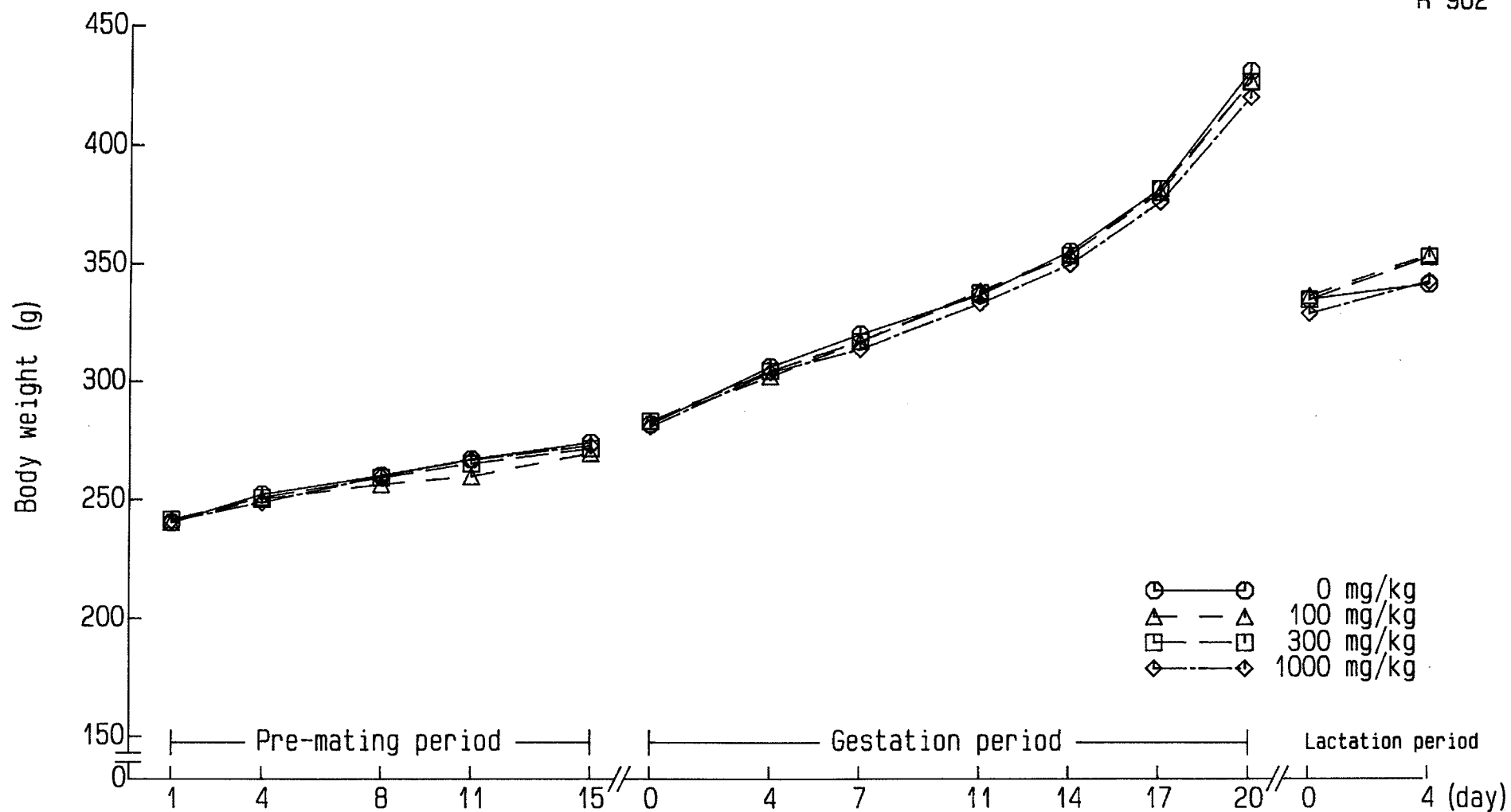


Fig.2 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration
Body weight changes of female rats

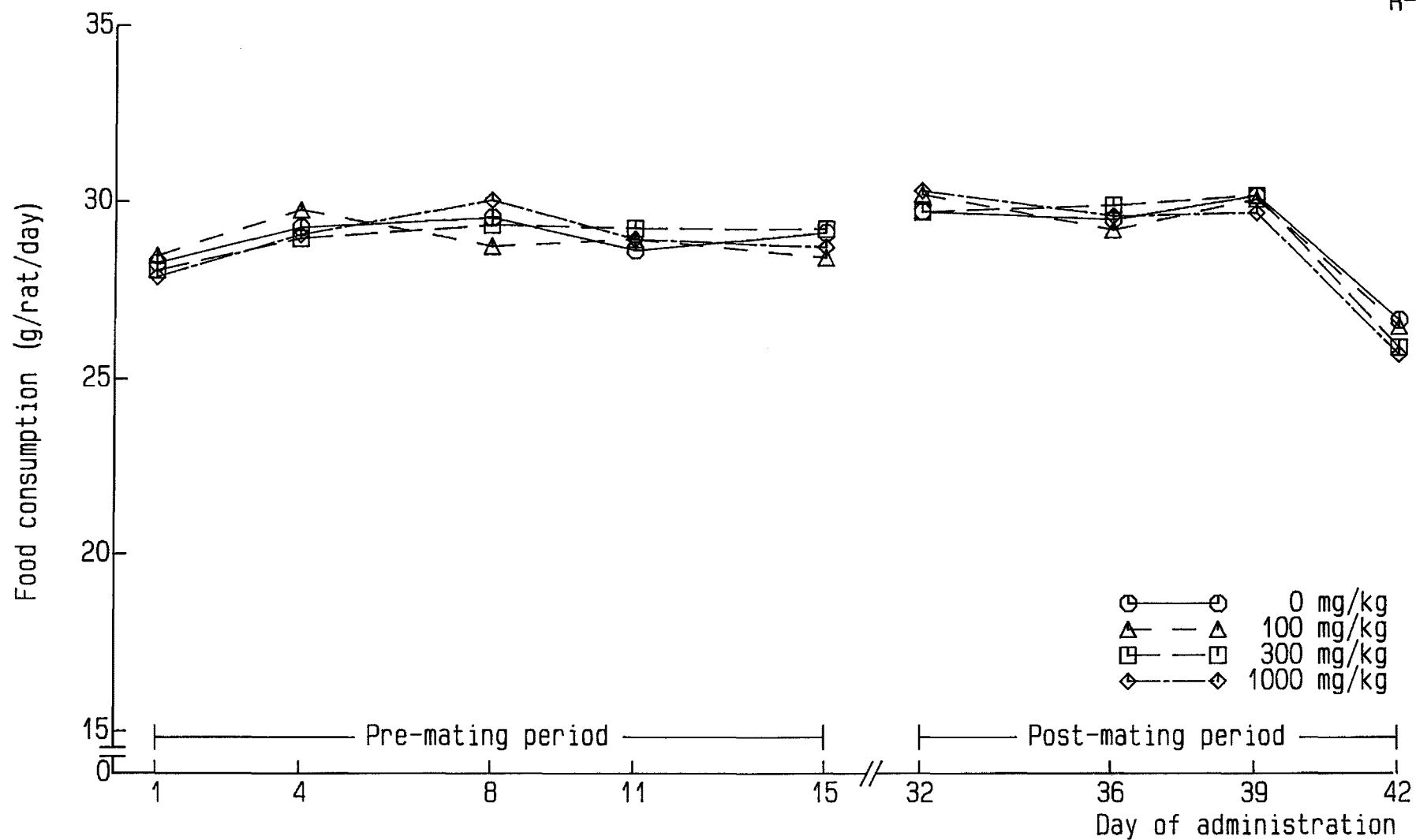


Fig.3 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration
Food consumption of male rats

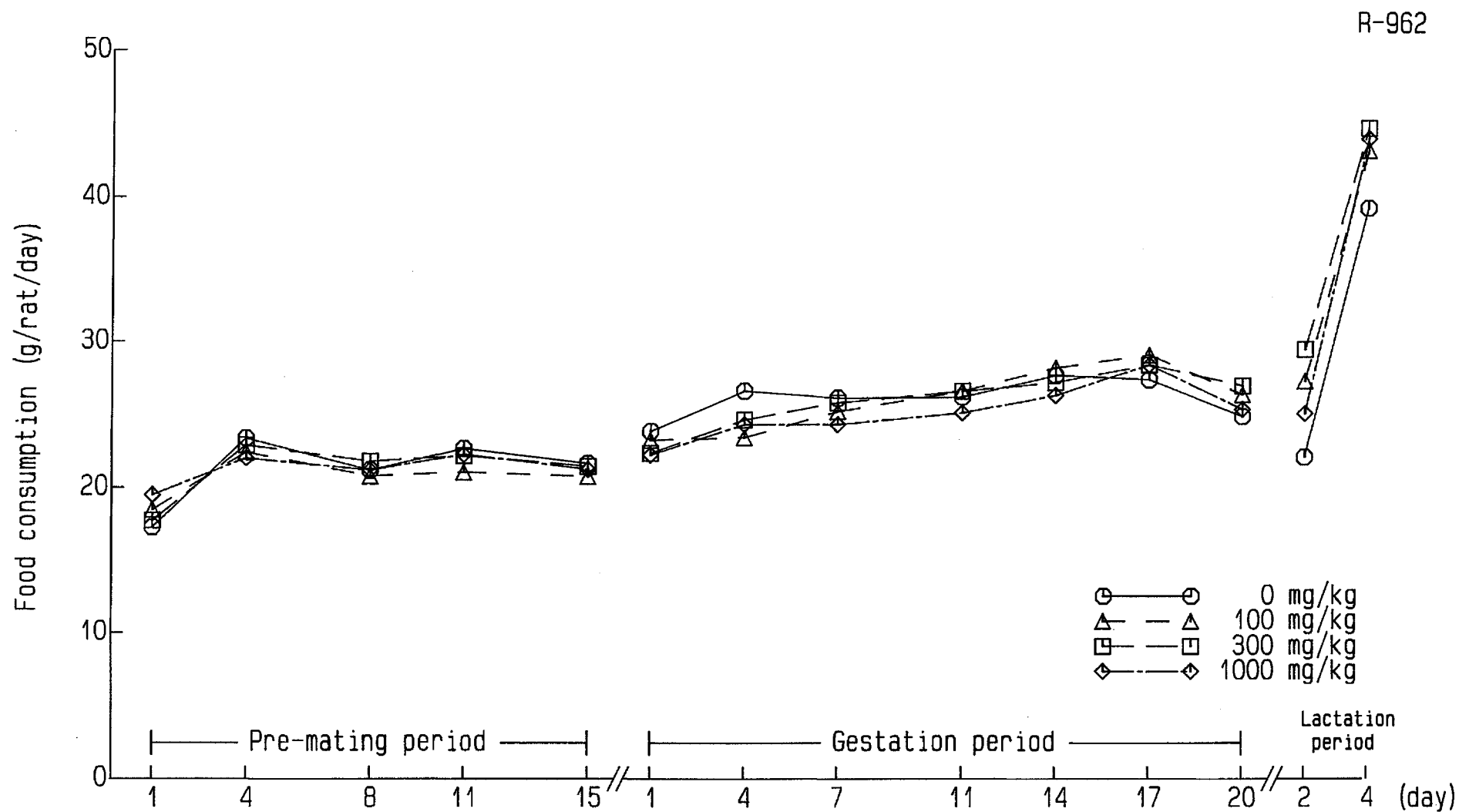


Fig.4 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration
Food consumption of female rats

Table 1-1 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Clinical signs in male rats

Dose mg/kg	Signs	Day of administration					
		1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
100	No. of animals	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
300	No. of animals	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	12	12	12	12	12	12
	Yellow feces	12	12	12	12	12	12
1000	No. of animals	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	12	12	12	12	12	12
	Yellow feces	12	12	12	12	12	12

Table 1-2

Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Clinical signs in female rats during the pre-mating period

[illegible]

Table 1-3

Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Clinical signs in dams during the gestation period

Dose mg/kg	Signs	Administration																							
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	0	
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	0	
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
300	No. of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	1	0
	No. of dams with abnormal findings	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	1	
	Yellow feces	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	1	
1000	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	0	
	No. of dams with abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9		
	Yellow feces	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9		

a): Day of gestation

Table 1-4 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Clinical signs in dams during the lactation period

Dose mg/kg	Signs	Administration				
		0	1	2	3	4a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
100	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
300	No. of dams	11	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	11	11	11	11	11
	Yellow feces	11	11	11	11	11
1000	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	12	12	12	12	12
	Yellow feces	12	12	12	12	12

a): Day of lactation

Table 2-1 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration
Body weight of male rats

Dose mg/kg	Pre-mating period					Mating period					Post-mating period				Gain 1-42
		1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	42a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	354.4	369.9	387.2	400.7	415.8	425.4	446.3	458.5	473.7	483.5	496.1	504.2	512.9	158.5
	S.D.	15.8	19.1	22.9	25.4	29.9	31.3	30.9	31.5	33.8	31.2	33.1	30.3	33.8	22.7
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	355.7	371.3	389.1	403.0	421.1	427.0	446.3	460.8	477.2	489.3	500.6	509.4	517.9	162.3
	S.D.	16.0	15.3	20.6	22.6	29.0	24.7	27.4	27.0	31.0	31.9	32.2	33.4	35.9	27.2
300	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	355.8	371.8	393.1	407.3	425.8	436.8	453.9	466.8	480.5	490.5	504.6	514.3	521.5	165.8
	S.D.	19.2	24.9	28.2	30.6	34.9	36.2	38.8	40.0	43.1	44.6	45.8	47.1	48.4	33.4
1000	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	355.8	372.8	394.4	405.7	423.4	428.8	448.4	460.6	475.6	486.9	500.5	506.2	513.0	157.2
	S.D.	16.2	18.1	23.3	24.8	27.8	28.7	30.9	32.0	36.1	37.6	37.5	40.0	42.1	29.3

Unit: g

No.: No. of animals

a): Day of administration

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-2

Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Body weight of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	Day of administration					Gain 1-15
	1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	240.4	252.4	260.3	267.2	274.4
	S.D.	11.2	9.7	10.9	14.7	15.6
100	No.	12	12	12	12	12
	Mean	240.8	250.4	256.6	260.1	269.8
	S.D.	12.2	9.0	14.5	15.9	18.0
300	No.	12	12	12	12	12
	Mean	241.8	251.0	259.4	265.3	271.9
	S.D.	10.7	10.6	11.6	12.7	11.7
1000	No.	12	12	12	12	12
	Mean	241.3	249.0	260.0	266.8	273.1
	S.D.	8.4	10.5	10.8	14.5	16.0

Unit: g

No.: No. of animals

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-3 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Body weight of dams during the gestation period

Dose mg/kg	Administration								Gain 0-20
		0	4	7	11	14	17	20a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	282.3	306.8	320.8	337.7	356.3	383.0	432.7	150.4
	S.D.	17.9	19.8	21.2	22.4	23.9	25.6	31.3	20.7
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	283.5	302.8	317.7	339.3	355.2	381.5	428.5	145.0
	S.D.	16.0	16.6	18.7	19.0	20.7	20.9	22.4	14.8
300	No.	11	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	283.6	305.1	317.7	338.4	354.5	383.2	428.2	144.5
	S.D.	19.4	17.8	17.4	18.9	18.5	19.2	21.0	12.9
1000	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	281.3	304.7	314.3	334.0	350.8	377.5	421.8	140.5
	S.D.	15.1	16.5	16.1	20.4	19.7	21.9	22.9	16.2

Unit: g

No.: No. of dams

a): Day of gestation

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-4

Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Body weight of dams during the lactation period

Dose mg/kg	Administration			Gain 0-4
		0	4a)	
0	No.	12	12	12
	Mean	336.5	342.8	6.3
	S.D.	29.7	21.5	18.2
100	No.	12	12	12
	Mean	337.8	355.0	17.3
	S.D.	25.5	18.1	16.3
300	No.	11	11	11
	Mean	336.2	354.3	18.1
	S.D.	15.2	18.7	15.0
1000	No.	12	12	12
	Mean	330.3	343.8	13.5
	S.D.	31.5	24.6	18.9

Unit: g

No.: No. of dams

a): Day of lactation

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 3-1 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Food consumption of male rats

Dose mg/kg	Pre-mating period					Post-mating period			
	1	4	8	11	15	32	36	39	42a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	28.3	29.3	29.6	28.7	29.2	29.8	29.6	30.3
	S.D.	2.7	3.0	3.3	3.2	3.0	2.0	2.2	2.1
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	28.5	29.8	28.8	29.0	28.5	30.3	29.3	30.2
	S.D.	1.2	2.1	2.8	2.9	2.8	2.5	2.4	4.0
300	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	28.1	29.0	29.4	29.3	29.3	29.8	30.0	30.3
	S.D.	3.3	3.6	3.6	3.3	3.7	3.1	3.2	3.1
1000	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	27.9	29.1	30.1	29.0	28.8	30.4	29.7	29.8
	S.D.	2.6	3.4	2.9	2.7	3.4	2.8	2.4	2.7

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

a): Day of administration

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 3-2

Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Food consumption of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration				
		1	4	8	11	15
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	17.3	23.4	21.2	22.7	21.7
	S.D.	3.6	2.7	2.1	3.4	3.1
100	No.	12	12	12	12	12
	Mean	18.5	22.4	20.8	21.1	20.8
	S.D.	3.2	2.7	2.4	2.4	2.8
300	No.	12	12	12	12	12
	Mean	17.8	22.9	21.8	22.2	21.5
	S.D.	2.4	2.6	2.1	2.5	2.9
1000	No.	12	12	12	12	12
	Mean	19.5	22.0	21.2	22.3	21.3
	S.D.	3.0	3.1	1.9	2.5	2.7

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 3-3 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Food consumption of dams during the gestation period

Dose mg/kg	Administration							
		1	4	7	11	14	17	20a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	23.9	26.7	26.2	26.3	27.8	27.5	25.0
	S.D.	2.9	3.4	3.8	2.3	2.6	3.4	2.9
100	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	23.3	23.5*	25.3	26.7	28.3	29.2	26.5
	S.D.	3.4	1.8D	2.6	2.6	3.3	3.7	3.1
300	No.	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	22.4	24.7	25.9	26.7	27.3	28.5	27.1
	S.D.	3.1	2.5	2.4	2.5	1.9	3.1	3.4
1000	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	22.3	24.4	24.4	25.2	26.4	28.5	25.5
	S.D.	3.3	3.1	3.7	3.4	3.0	3.2	3.2

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Day of gestation

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

D: Dunnett's test

Table 3-4

Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Food consumption of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration	
		2	4a)
0	No.	12	12
	Mean	22.2	39.4
	S.D.	6.8	6.5
100	No.	12	12
	Mean	27.4	43.4
	S.D.	6.4	5.7
300	No.	11	11
	Mean	29.6*	44.9
	S.D.	4.2D	6.2
1000	No.	12	12
	Mean	25.2	44.2
	S.D.	9.5	8.5

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Day of lactation

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

D: Dunnett's test

Table 4 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Organ weight of male rats

Dose mg/kg		Body weight g	Testis (R+L) g(g/100g BW)	Epididymis (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	12	12
		Mean	516	1223
		S.D.	37	85
	100	No.	12	12
		Mean	522	1240
		S.D.	34	55
	300	No.	12	12
		Mean	526	1184
		S.D.	49	200
	1000	No.	12	12
		Mean	517	1278
		S.D.	43	72
Relative	0	No.	12	12
		Mean	0.63	239
		S.D.	0.10	27
	100	No.	12	12
		Mean	0.63	239
		S.D.	0.05	19
	300	No.	12	12
		Mean	0.62	225
		S.D.	0.11	35
	1000	No.	12	12
		Mean	0.69	249
		S.D.	0.07	16

*: $p < 0.05$ (Significant difference from control group)
DT: Dunnett-type rank test

Table 5 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Gross pathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 12	100 12	300 12	1000 12	0 12	100 12	300 12	1000 12
Liver									
Hepatodiaphragmatic nodule		1	0	0	0	0	0	0	0
Testis									
Small		0	0	1	0	-	-	-	-
Urinary bladder									
Thickening, wall		0	0	0	0	0	1	0	0
Calculus		0	0	0	0	0	1	0	0
Uterus									
Polyp		-	-	-	-	1	0	0	0

- : Not applicable

Table 6 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
	Dose(mg/kg):	0	100	300	1000	0	100	300	1000
Findings	Number:	12	12	12	12	12	12	12	12
Epididymis									
Number examined		12	0	0	12	-	-	-	-
Not remarkable		11	0	0	11	-	-	-	-
Granuloma, spermatic		0	0	0	1	-	-	-	-
minimal		0	0	0	1	-	-	-	-
Hypospermia		1	0	0	0	-	-	-	-
minimal		1	0	0	0	-	-	-	-
Increased cell debris, lumen		1	0	0	0	-	-	-	-
minimal		1	0	0	0	-	-	-	-
Ovary									
Number examined		-	-	-	-	12	0	0	12
Not remarkable		-	-	-	-	12	0	0	12
Testis									
Number examined		12	0	1	12	-	-	-	-
Not remarkable		11	0	0	11	-	-	-	-
Atrophy, seminiferous tubular		1	0	1	1	-	-	-	-
minimal		0	0	0	1	-	-	-	-
mild		1	0	0	0	-	-	-	-
severe		0	0	1	0	-	-	-	-
Liver									
Number examined		1	0	0	0	0	0	0	0
Hepatodiaphragmatic nodule		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0
Urinary bladder									
Number examined		0	0	0	0	0	1	0	0
Calculus		0	0	0	0	0	1	0	0
mild		0	0	0	0	0	1	0	0
Hyperplasia, transitional, diffuse		0	0	0	0	0	1	0	0
moderate		0	0	0	0	0	1	0	0
Uterus									
Number examined		-	-	-	-	1	0	0	0
Retained placenta		-	-	-	-	1	0	0	0
mild		-	-	-	-	1	0	0	0

- : Not applicable

Table 7

Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Estrous cycle in female rats during the pre-mating period (Main group)

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus					Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4	
0	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5
100	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5
300	12	0	0	0	5	7	3.6±0.5
1000	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Mating and fertility of animals

Dose mg/kg	Male				Female			
	No. of males	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Insemination index (%) b)	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) c)
0	12	2.7±1.0	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.7±1.0	12/12(100.0)	12/12(100.0)
100	12	3.4±1.4	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	3.4±1.4	12/12(100.0)	12/12(100.0)
300	12	3.7±2.8	12/12(100.0)	11/12(91.7)	12	3.7±2.8	12/12(100.0)	11/12(91.7)
1000	12	3.0±1.0	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	3.0±1.0	12/12(100.0)	12/12(100.0)

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

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

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

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 9 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Delivery data on dams

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females with live pups	Delivery index % a)	Gestation period	No. of corpora lutea	No. of implan- tation sites	Implan- tation index % b)	No. of stillborn pups (%)c)	No. of liveborn pups	Live birth index % d)
0	Total	12	12	100.0		198	190		2	172	
	Mean				22.1	16.5	15.8	95.9	(1.0)	14.3	99.0
	S.D.				0.4	1.7	1.9	5.5	(2.4)	3.3	2.4
100	Total	12	12	100.0		183	178		0	167	
	Mean				21.9	15.3	14.8	97.5	(0.0)	13.9	100.0
	S.D.				0.4	1.4	1.1	4.0	(0.0)	1.4	0.0
300	Total	11	11	100.0		182	173		2	161	
	Mean				22.3	16.5	15.7	95.2	(1.2)	14.6	98.8
	S.D.				0.4	1.2	1.0	4.4	(4.0)	1.5	4.0
1000	Total	12	12	100.0		197	187		5	163	
	Mean				22.1	16.4	15.6	95.0	(3.2)	13.6	96.8
	S.D.				0.4	2.2	2.1	4.8	(6.0)	2.5	6.0

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

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

c): (No. of stillborn pups / No. of stillborn and liveborn pups) × 100

d): (No. of liveborn pups / No. of stillborn and liveborn pups) × 100

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 10 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration
External examination of liveborn pups

Dose mg/kg	No. of dams		No. of males	No. of females	Sex ratio a)	Body weight(g)		External b) abnor- malities(%)c)
						Male	Female	
0	12	Total	96	76	0.56			0
		Mean	8.0	6.3		6.6	6.3	(0.0)
		S.D.	2.5	2.7		0.5	0.5	(0.0)
100	12	Total	87	80	0.52			0
		Mean	7.3	6.7		6.6	6.2	(0.0)
		S.D.	1.8	2.0		0.7	0.6	(0.0)
300	11	Total	72	89	0.45			0
		Mean	6.5	8.1		6.8	6.4	(0.0)
		S.D.	2.8	2.3		0.6	0.5	(0.0)
1000	12	Total	86	77	0.53			0
		Mean	7.2	6.4		6.6	6.1	(0.0)
		S.D.	2.1	2.9		0.4	0.4	(0.0)

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

b): No. of liveborn pups with external abnormalities

c): (No. of liveborn pups with external abnormalities / No. of liveborn pups) × 100

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 11 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Viability index of pups

Dose mg/kg		No. of dams	No. of live pups		Viability index on day 4 after birth % a)
			Day 0	Day 4	
0	Total	12	172	160	
	Mean		14.3	13.3	93.7
	S.D.		3.3	2.8	6.1
100	Total	12	167	163	
	Mean		13.9	13.6	97.4
	S.D.		1.4	1.8	6.1
300	Total	11	161	160	
	Mean		14.6	14.5	99.5*
	S.D.		1.5	1.4	1.8DT
1000	Total	11 ^{b)}	147	146	
	Mean		13.4	13.3	99.2*
	S.D.		2.5	2.6	2.5DT

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

b): Data was excluded from statistical analysis because pups had died of an accident in one dam (animal No. 4112).

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

DT: Dunnett-type rank test

Table 12 Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Body weight of pups

Dose mg/kg		Male		Female	
		0	4	0	4a)
0	No.	12	12	12	12
	Mean	6.6	10.2	6.3	9.9
	S.D.	0.5	1.4	0.5	1.3
100	No.	12	12	12	12
	Mean	6.6	10.3	6.2	9.9
	S.D.	0.7	1.5	0.6	1.3
300	No.	11	11	11	11
	Mean	6.8	10.3	6.4	9.8
	S.D.	0.6	1.0	0.5	1.0
1000	No.	12	11 ^{b)}	11 ^{c)}	10 ^{b)}
	Mean	6.6	9.9	6.1	9.4
	S.D.	0.4	1.0	0.4	0.9

Unit: g

No.: No. of dams

a): Day after birth

b): Data was excluded from statistical analysis because pups had died of an accident in one dam (animal No. 4112).

c): Female pups were not born in one dam.

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 13

Reproduction/Developmental toxicity screening test of Pigment yellow 14
by oral administration

Gross pathological findings in pups on day 4 after birth

	Dose (mg/kg)	0	100	300	1000
Male					
No. of pups examined		91	84	71	82
No. of pups with abnormal findings		2	0	0	0
Thymic remnant in neck		2	0	0	0
Female					
No. of pups examined		69	79	89	65
No. of pups with abnormal findings		0	2	0	0
Thymic remnant in neck		0	2	0	0