

最終報告書

ピグメントオレンジ 16 のラットを用いる
経口投与簡易生殖試験

2007 年 2 月 23 日

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
東京都千代田区霞が関 1 丁目 2 番 2 号 (〒100-8916)

試験施設： 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ
熊本県宇土市栗崎町 1285 番地 (〒869-0425)

1. 目次

1. 目次.....	1
4. 要約.....	11
4.1. 反復投与毒性.....	11
4.2. 生殖発生毒性.....	11
5. 試験材料及び方法.....	12
5.1. 被験物質及び媒体.....	12
5.1.1. 被験物質.....	12
5.1.2. 媒体.....	13
5.2. 試験系.....	14
5.2.1. 種及び系統.....	14
5.2.2. 試験系選択の理由	14
5.2.3. 購入動物数及び性別.....	14
5.2.4. 供給源.....	14

5.2.5. 生産場.....	14
5.2.6. 週齢.....	15
5.2.7. 入荷時体重範囲.....	15
5.2.8. 検疫, 飼化.....	15
5.2.9. 検疫馴化期間中の識別方法.....	15
5.2.10. 群分け.....	15
5.2.11. 群分け後の識別方法.....	15
5.3. 試験系の環境条件.....	16
5.3.1. 飼育環境.....	16
5.3.2. 飼料.....	17
5.3.3. 飲水.....	17
5.3.4. 床敷.....	18
5.3.5. 飼育器材の交換頻度.....	18
5.3.6. 洗浄及び消毒.....	18
5.4. 被験物質と媒体との混合物の調製法及び調製頻度.....	18
5.4.1. 調製法.....	18
5.4.2. 調製頻度.....	18
5.4.3. 混合物中での被験物質の安定性及び均一性.....	19
5.4.4. 投与液の保存条件及び保存場所.....	19
5.4.5. 投与液の識別法.....	19
5.5. 混合物中の被験物質濃度測定.....	19
5.6. 投与方法, 投与量及び群構成.....	19
5.6.1. 投与経路.....	19
5.6.2. 投与経路の選択理由.....	19
5.6.3. 投与方法.....	19
5.6.4. 投与時刻.....	20
5.6.5. 投与回数及び投与期間.....	20
5.6.6. 投与量.....	20
5.6.7. 投与量設定の根拠.....	20
5.6.8. 群構成.....	20

5.7.	観察、検査、分析及び測定の頻度並びに方法	21
5.7.1.	雄動物の観察、測定及び検査	21
5.7.2.	雌動物の観察、測定及び検査	22
5.7.3.	F_1 出産児の観察	23
5.8.	試験途中の死亡例及び瀕死例の処置	23
5.9.	統計学的処理	24
5.9.1.	親動物	24
5.9.2.	F_1 出生児	24
5.10.	動物の適正使用	25
6.	試験結果	26
6.1.	反復投与毒性	26
6.1.1.	一般状態	26
6.1.2.	体重	26
6.1.3.	摂飢量	26
6.1.4.	剖検	26
6.1.5.	器官重量	26
6.1.6.	病理組織学的検査	26
6.2.	生殖発生毒性	27
6.2.1.	性周期検査及び生殖能力検査	27
6.2.2.	分娩及び哺育期検査	27
7.	考察	28
7.1.	反復投与毒性	28
7.2.	生殖発生毒性	28
8.	参考文献	29

Fig.1	Mean body weight changes of male rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test	30
Fig.2	Mean body weight changes of female rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test	31

Fig.3	Mean food consumption of male rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	32
Fig.4	Mean food consumption of female rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	33
Table 1	Clinical signs of male rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	34
Table 2	Clinical signs of female rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	37
Table 3	Body weights of male rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	41
Table 4	Body weights of female rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	42
Table 5	Food consumption of male rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	44
Table 6	Food consumption of female rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	45
Table 7	Necropsy findings of male rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	47
Table 8	Necropsy findings of F ₀ dams treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	48
Table 9	Necropsy findings of female rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test - Non-pregnant.....	49
Table 10	Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	50
Table 11	Absolute and relative organ weights of F ₀ dams treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	51
Table 12	Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test - Non-pregnant.....	52

Table 13 Histopathological findings of male rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	54
Table 14 Histopathological findings of F ₀ dams treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test	55
Table 15 Histopathological findings of female rats reated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test - Non-pregnant.....	56
Table 16 Reproductive performance of rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	57
Table 17 Terminal delivery of F ₀ dams treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.....	58

4. 要約

OECD 既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、ピグメントオレンジ 16 の 0(媒体対照), 100, 300 及び 1000 mg/kg/day を Crl:CD (SD) ラットの雌雄(各 12 匹/群)に交配前 14 日間、雄ではその後交配期間を含む 35 日間、雌では交配期間、妊娠期間及び哺育 3 日まで通して経口投与し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

4.1. 反復投与毒性

ピグメントオレンジ 16 各群で被験物質様物混入便が認められた。本変化は、被験物質の性状がオレンジ色の粉末であることに起因した変化であり、毒性学的変化ではないと考えられた。

体重、摂餌量、剖検所見及び病理組織学的検査においてピグメントオレンジ 16 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

4.2. 生殖発生毒性

性周期検査では、発情周期及び発情回数においてピグメントオレンジ 16 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

生殖能力検査では、交尾率、受胎率及び交尾所要日数においてピグメントオレンジ 16 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

分娩時の検査では、黄体数、着床痕数、着床率、妊娠期間、出産児数、出生率、出生児数、雌雄出生児体重、死産率、出産率、出生児の性比及び外観異常率においてピグメントオレンジ 16 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

哺育期の検査では、新生児の 4 日の生存率及び体重においてピグメントオレンジ 16 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

以上のように、本試験条件下におけるピグメントオレンジ 16 の反復投与による親動物の生殖に対する無影響量及び新生児の発生・発育に対する無影響量はいずれも 1000 mg/kg/day 以上と考えられた。

5. 試験材料及び方法

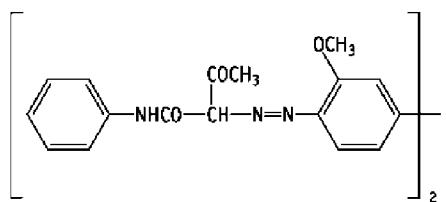
5.1. 被験物質及び媒体

5.1.1. 被験物質

5.1.1.1. 名称

ピグメントオレンジ 16 (C.I. Pigment Orange 16, 添付資料 1)

5.1.1.2. 構造式



5.1.1.3. ロット番号

5.1.1.4. CAS 番号

6505-28-8

5.1.1.5. 入手量

3 kg

5.1.1.6. 供給源から入手した日

2005年3月9日

5.1.1.7. 供給源

5.1.1.8. 性状

オレンジ色の粉末

5.1.1.9. 純度

99 wt%以上 (水分 0.12%, 水可溶分 0.21%)

5.1.1.10. 安定性

投与終了後に被験物質を供給源に返却して供給源が分析を行い、安定性を確認した（添付資料 2 及び 3）。

5.1.1.11. 保存条件及び保存場所

被験物質室（61）の保管庫内に室温で保存した（許容範囲：1～30°C, 実測値：17.6～24°C）。

5.1.1.12. 取扱い注意事項

保護メガネ、マスク及びゴム手袋を着用し、皮膚に付着しないよう注意した。

5.1.1.13. 保存用被験物質

使用ロットから 5 g 採取して保存した。

5.1.1.14. 残余の被験物質

供給源に返却する予定である。

5.1.2. 媒体

5.1.2.1. 名称

トウモロコシ油

5.1.2.2. ロット番号

V4G2385 及び V4K3008

5.1.2.3. 入手量

ロット番号 V4G2385 : 20 L

ロット番号 V4K3008 : 5 L

5.1.2.4. 製造元

ナカライトスク株式会社

5.1.2.5. 性状

無色透明の液体

5.1.2.6. 保存条件及び保存場所

被験物質室（61）の保管庫内に室温で保存した。

5.1.2.7. 取扱い注意事項

特になし

5.2. 試験系**5.2.1. 種及び系統**

ラット, Crl:CD (SD)

5.2.2. 試験系選択の理由

「OECD 毒性試験ガイドライン」で、げっ歯類を用いた試験データが要求されていること、及び本系統は毒性試験に汎用されており、バックグラウンドデータが豊富である。

5.2.3. 購入動物数及び性別

雌雄各 55 匹、合計 110 匹

5.2.4. 供給源

日本チャールス・リバー株式会社

神奈川県横浜市港北区新横浜 3-17-6 (〒222-0033)

5.2.5. 生産場

厚木飼育センター

神奈川県厚木市下古沢 795 番地 (〒243-0314)

5.2.6. 週齢

入荷時	: 雌雄共 8 週齢
投与開始時	: 雌雄共 10 週齢

5.2.7. 入荷時体重範囲

雄 243.7～284.8 g, 雌 163.1～200.6 g

5.2.8. 検疫, 飼化

入荷時に種, 系統, 週齢, 動物数及び性別を確認し, 一般状態及び外観を観察するとともに体重を測定した. 検疫馴化期間は 11 日間とし, この間に一般状態の観察を 1 日 1 回及び体重測定を 4 回（入荷日及び群分け日を含む）行い, 健康な動物のみを試験に供した. また, 雌については群分け日の 10 日前から膣スメアを採取し, 発情期が約 4 日で正常に回帰していることを確認した.

5.2.9. 検疫馴化期間中の識別方法

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

5.2.10. 群分け

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

5.2.11. 群分け後の識別方法

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

5.3. 試験系の環境条件

5.3.1. 飼育環境

5.3.1.1. 飼育室番号

バリアーシステム C 区域内の飼育室 93 番

5.3.1.2. 飼育ケージ

ステンレススチール製 (W260 × H200 × D380 mm)

ポリメチルペンテン製 (W265 × H185 × D425mm)

5.3.1.3. ケージ架台

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

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

5.3.1.4. 収容動物数

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

5.3.1.5. 温度

22~25°C (許容範囲 21~27°C)

5.3.1.6. 湿度

53~63% (許容範囲 35~75%)

5.3.1.7. 照明

午前 7 時点灯、午後 7 時消灯の 12 時間

5.3.1.8. 換気回数

10~20 回／時

5.3.2. 飼料

5.3.2.1. 種類

固型飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社)

5.3.2.2. 滅菌方法

高压蒸気滅菌

5.3.2.3. 給餌方法

自由摂取

5.3.2.4. 分析

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

5.3.3. 飲水

5.3.3.1. 種類

井戸水

5.3.3.2. 消毒方法

次亜塩素酸ナトリウムを添加 (約 2 ppm)

5.3.3.3. 給水方法

自由摂取 (自動給水装置又は給水瓶)

5.3.3.4. 分析

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

5.3.4. 床敷

5.3.4.1. 種類

ホワイトフレーク（日本チャールス・リバー株式会社）

5.3.4.2. 滅菌方法

高压蒸気滅菌

5.3.5. 飼育器材の交換頻度

ケージ架台 : 4週間に1回交換

ステンレススチール製ケージ : 2週間に1回交換

ポリメチルペンテン製ケージ : 1週間に1~2回交換

受皿 : 1週間に2回交換（ただし、交配期間中の雄及び一般状態観察において被験物質様物混入便がみられた動物は毎日交換）

給水瓶 : 1週間に2~3回交換

5.3.6. 洗浄及び消毒

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

5.4. 被験物質と媒体との混合物の調製法及び調製頻度

5.4.1. 調製法

調製は濃度ごとに実施した。

- 1) 必要量の被験物質を調製濃度ごとに正確に秤量した。
- 2) 終調製量の6~7割の媒体が入ったビーカーに、秤量した被験物質を入れた。
- 3) スターラーで攪拌し、懸濁液とした。
- 4) 懸濁状態になったことを確認したのち、媒体でメスアップした。
- 5) 転倒混和し、必要量をバイアルに分注した。

5.4.2. 調製頻度

1~2回／週

5.4.3. 混合物中での被験物質の安定性及び均一性

本被験物質はいずれの溶媒にも溶解性を示さないため、混合物中の化学分析は不可能と判断し、安定性及び均一性の確認は実施しなかった。

5.4.4. 投与液の保存条件及び保存場所

飼育区域に設置した保管庫内に室温（許容範囲：1～30°C、実測値：24～26°C）で保存した。なお、調製直後は一時的に被験物質室（61）に室温（許容範囲：1～30°C、実測値：19～23°C）で保存した。

5.4.5. 投与液の識別法

投与液を入れた褐色ガラス容器に、試験番号、被験物質名、被験物質濃度、投与量、調製日、保存条件、使用期限及び調製者名を記入したラベルを貼付した。

5.5. 混合物中の被験物質濃度測定

本被験物質はいずれの溶媒にも溶解性を示さないため、混合物中の化学分析は不可能と判断し、被験物質濃度測定は実施しなかった。

5.6. 投与方法、投与量及び群構成

5.6.1. 投与経路

経口投与

5.6.2. 投与経路の選択理由

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

5.6.3. 投与方法

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

5.6.4. 投与時刻

午前中に投与した。ただし、分娩中の動物は分娩終了後に投与した。

5.6.5. 投与回数及び投与期間

雄は交配前 14 日間及びその後 35 日間の合計 49 日間、雌は交配前 14 日間、交配期間（交尾成立までの最長 11 日間）、妊娠期間及び哺育 3 日までの期間、それぞれ 1 日 1 回投与連日投与した。「OECD 毒性試験ガイドライン」に準じた。なお、投与開始日を投与 1 日とした。

5.6.6. 投与量

100, 300 及び 1000 mg/kg とした。投与容量は 10 mL/kg とし、対照群には同容量の媒体を投与した。交配前投与期間中及び交配期間中の投与液量は最新体重を基に算出し、交尾成立後の雌の投与液量は妊娠 0 日及び哺育 0 日の体重を基に算出した。

5.6.7. 投与量設定の根拠

本試験に先立って実施した 28 日間反復経口投与毒性試験（財団法人 食品薬品安全センター、投与量；100, 300 及び 1000 mg/kg）の結果から設定した。その結果、一般状態では被験物質と同様のオレンジ色の便が排泄されたが、この他に被験物質投与に起因したと考えられる一般状態の変化はなかった。体重、摂餌量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査及び器官重量を含む病理学検査では、いずれも被験物質投与に起因したと考えられる変化は認められず、無影響量は、雌雄とも 1000 mg/kg であると判断された。したがって、本試験では 1000 mg/kg を高用量とし、以下公比約 3 で除した 300 mg/kg 及び 100 mg/kg を中用量及び低用量に設定した。

5.6.8. 群構成

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性別	使用動物数		動物番号
					総数		
対照 ^a	0	0	10	雄	12		1~12
				雌	12		51~62
低用量	100	10	10	雄	12		13~24
				雌	12		63~74
中用量	300	30	10	雄	12		25~36
				雌	12		75~86
高用量	1000	100	10	雄	12		37~48
				雌	12		87~98

a : 媒体を投与

5.7. 観察、検査、分析及び測定の頻度並びに方法

5.7.1. 雄動物の観察、測定及び検査

5.7.1.1. 一般状態

投与期間中は毎日投与前、投与後の2回、一般状態の観察及び生死の確認を行った。

5.7.1.2. 体重

投与期間を通して週2回の頻度で測定した。

5.7.1.3. 摂餌量

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

5.7.1.4. 剖検

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

5.7.1.5. 器官重量の測定

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

5.7.1.6. 病理組織学検査

精巣、精巣上体をブアン液で前固定した後、10 vol%中性緩衝ホルマリン溶液で固定して保存した。対照群及び高用量群の精巣、精巣上体はパラフィン切片としたのち、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。検査の結果、高用量群に被験物質投与の影響が認められなかつたため、中間量及び低用量は鏡検しなかつた。ただし、中間量の1例（No.36）は交尾相手の雌が不妊であったため、精巣及び精巣上体を鏡検した。

5.7.2. 雌動物の観察、測定及び検査

5.7.2.1. 一般状態

投与期間中は毎日投与前、投与後の2回、一般状態の観察及び生死の確認を行った。

5.7.2.2. 体重

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

5.7.2.3. 摂餌量

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

5.7.2.4. 性周期検査

投与期間中の雌について、毎日午前の一定時間に、綿棒にて膣垢を採取し、性周期の観察を行った。性周期は休止期（D）、発情前期（P）、発情期（E）及び発情後期（M）に分類し、検査期間中における発情期（E）から次の発情期（E）までの平均日数（発情周期）及び発情回数を算出した。

5.7.2.5. 生殖能力検査

交配は雌雄共に12週齢に達した時点から開始した。同一群内で雌雄各1匹ずつを一晩同居させ、翌朝膣垢中の精子又は膣栓が確認された雌を交尾成立とし、その日を妊娠0日として起算した。交配期間は最長2週間としたが、交配11日目までに全例で交尾が認められたため、再交配（1週間）は実施しなかった。検査成績から、交尾所要日数、交尾率及び受胎率を算出した。

5.7.2.6. 分娩時検査及び哺育期検査

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

5.7.2.7. 剖検

母動物は哺育 4 日にエーテル麻酔下で外側腸骨動脈切断により放血致死させ、速やかに解剖してすべての器官及び組織について異常の有無を綿密に検査するとともに、卵巣及び子宮を摘出し、黄体数及び着床痕数を算定した。分娩しない動物については妊娠 24 日にエーテル麻酔下で外側腸骨動脈切断により放血致死させ剖検し、妊娠の有無を確認した。

5.7.2.8. 器官重量の測定

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

5.7.2.9. 病理組織学的検査

卵巣を 10 %中性緩衝ホルマリン溶液で固定して保存した。対照群及び高用量群の卵巣はパラフィン切片としたのち、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。検査の結果、高用量群に被験物質投与の影響が認められなかつたため、中間量及び低用量は鏡検しなかつた。ただし、中間量の 1 例（No.86）は不妊であったため、卵巣を鏡検した。

5.7.3. F₁出産児の観察

5.7.3.1. 分娩時検査及び哺育期検査

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

5.7.3.2. 剖検

哺育 4 日にエーテル麻酔下で放血致死させ、器官・組織の肉眼的観察を行った。異常が認められた器官・組織は、10 vol%中性緩衝ホルマリン溶液に固定保存した。剖検後、出生児の胸部及び腹部の器官・組織を取り除き、カーカスを純エタノールに一腹単位で固定保存した。また、死産児及び死亡児についても剖検し、カーカスを純エタノールに固定保存した。

5.8. 試験途中の死亡例及び瀕死例の処置

試験途中死亡例及び瀕死例はなかつた。

5.9. 統計学的処理

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

5.9.1. 親動物

5.9.1.1. 多重比較

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

5.9.1.2. Mann-Whitney の U 検定

病理組織学的検査

5.9.1.3. χ^2 検定

交尾率（交尾動物数/同居動物数）×100

受胎率（妊娠動物数/交尾動物数）×100

出産率（生児出産雌数/妊娠雌数）×100

5.9.2. F₁出生児

5.9.2.1. 多重比較

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

5.9.2.2. χ^2 検定

性比 : (雄出生児数/雌出生児数)

5.9.2.3. Wilcoxon の順位和検定法（両側検定）

着床率	: (着床数/黄体数) ×100
死産率	: (死産児数/出産児数) ×100
外表異常率	: (異常児数/検査児数) ×100
型別外表異常児出現率	: (型別異常児数/検査児数) ×100
出生率	: (出生児数/着床痕数) ×100
新生児の 4 日の生存率	: (哺育 4 日の生児数/出生児数) ×100

5.10. 動物の適正使用

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

6. 試験結果

6.1. 反復投与毒性

6.1.1. 一般状態

観察結果を Table 1, 2 及び Appendix 1, 2 に示した。

ピグメントオレンジ 16 各群の雌雄全例で被験物質様物混入便が認められた。本変化は投与 2 日から投与期間終了まで継続して認められた。

6.1.2. 体重

体重の推移を Fig. 1, 2, Table 3, 4 及び Appendix 3, 4 に示した。

ピグメントオレンジ 16 各群の雌雄で投与期間を通して対照群との差は認められなかった。

6.1.3. 摂餌量

摂餌量の推移を Fig. 3, 4, Table 5, 6 及び Appendix 5, 6 に示した。

ピグメントオレンジ 16 各群の雌雄で投与期間を通して被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

なお、100 及び 300 mg/kg 群の雌で妊娠 20 日に摂餌量の有意な低値が認められたが、軽微な変化であり、1000 mg/kg 群で同様の変化が認められていないことから偶発的な変化と判断した。

6.1.4. 割検

検査結果を Table 7~9 及び Appendix 7, 8 に示した。

ピグメントオレンジ 16 各群の雌雄で変化は認められなかった。

6.1.5. 器官重量

測定結果を Table 10~12 及び Appendix 9, 10 に示した。

ピグメントオレンジ 16 各群の雌雄で精巣、精巣上体及び卵巣重量において対照群との有意な差は認められなかった。

6.1.6. 病理組織学的検査

検査結果を Table 13~15 及び Appendix 11, 12 に示した。

ピグメントオレンジ 16 各群の雌雄で精巣、精巣上体及び卵巣において被験物質投与に関連した

変化は認められなかった。

なお、1000 mg/kg群の雄1例で精巣上体の軽度の精子肉芽腫、対照群及び300 mg/kg群の雄各1例で精巣の軽度の精細管の萎縮が認められた。これらの変化のうち、精巣上体の軽度の精子肉芽腫については、自然発生の報告があり¹⁾、本試験での発生例数も少ないとから、被験物質投与との関連はないと判断した。一方、精巣の軽度の精細管の萎縮については、同様の変化が1000 mg/kg群で認められていないことから、被験物質投与との関連はないと判断した。

6.2. 生殖発生毒性

6.2.1. 性周期検査及び生殖能力検査

検査結果をTable 16及びAppendix 13, 14に示した。

性周期検査では、発情周期及び発情回数において対照群との有意な差は認められなかった。

生殖能力検査では、対照群及びピグメントオレンジ16各群の全例で交尾がみられ、交尾率はいずれの群も100%であった。不妊動物は、対照群、300及び1000 mg/kg群の各1例認められ、受胎率は対照群、100、300及び1000 mg/kg群でそれぞれ91.67%, 100%, 91.67%及び91.67%であった。受胎率において対照群とピグメントオレンジ16各群との間に有意な差は認められなかった。また、交尾所要日数においても対照群とピグメントオレンジ16各群との間に有意な差は認められなかった。

6.2.2. 分娩及び哺育期検査

検査結果をTable 17及びAppendix 15に示した。

分娩時の検査では、黄体数、着床痕数、着床率、妊娠期間、出産児数、出生率、出生児数、雌雄出生児体重、死産率、出産率、出生児の性比及び外表異常率において対照群とピグメントオレンジ16各群との間に有意な差は認められなかった。

哺育期の検査では、新生児の4日の生存率及び体重において対照群とピグメントオレンジ16各群との間に有意な差は認められなかった。

7. 考察

ピグメントオレンジ 16 の安全性に関する毒性試験の一環として、交配前 14 日間、雄ではその後交配期間を含む 35 日間、雌では交配期間、妊娠期間及び哺育 3 日まで経口投与し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

7.1. 反復投与毒性

ピグメントオレンジ 16 各群で被験物質様物混入便が認められた。先に実施した 28 日間反復経口投与毒性試験²⁾では、被験物質と同様のオレンジ色の便が認められており、この他には被験物質投与に起因したと考えられる一般状態の変化はなかった。また、体重、摂餌量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査において被験物質投与に起因した変化は認められていない。従って、本試験で認められた被験物質様物混入便は、被験物質の性状がオレンジ色の粉末であることに起因した変化であり、毒性学的変化ではないと考えられた。

体重、摂餌量、剖検所見及び病理組織学的検査においてピグメントオレンジ 16 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

7.2. 生殖発生毒性

性周期検査では、発情周期及び発情回数においてピグメントオレンジ 16 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

生殖能力検査では、交尾率、受胎率及び交尾所要日数においてピグメントオレンジ 16 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

分娩時の検査では、黄体数、着床痕数、着床率、妊娠期間、出産児数、出生率、出生児数、雌雄出生児体重、死産率、出産率、出生児の性比及び外表異常率においてピグメントオレンジ 16 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

哺育期の検査では、新生児の 4 日の生存率及び体重においてピグメントオレンジ 16 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

以上のように、本試験条件下におけるピグメントオレンジ 16 の反復投与による親動物の生殖に対する無影響量及び新生児の発生・発育に対する無影響量はいずれも 1000 mg/kg/day 以上と考えられた。

8. 参考文献

- 1) Takahisa Noto et al. (1999): Spontaneous Lesions in Crj:CD(SD) IGS Rats Versus in Jcl:SD Rats Used in Toxicity Studies – Histopathological Findings -, Biological Reference Data on CD(SD)IGS Rats, pp.23-28.
- 2) 畑上二郎ら (2001), ピグメントオレンジ 16 のラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, 化学物質毒性試験報告, 8 (2), 1037-1046

Study No.P041489

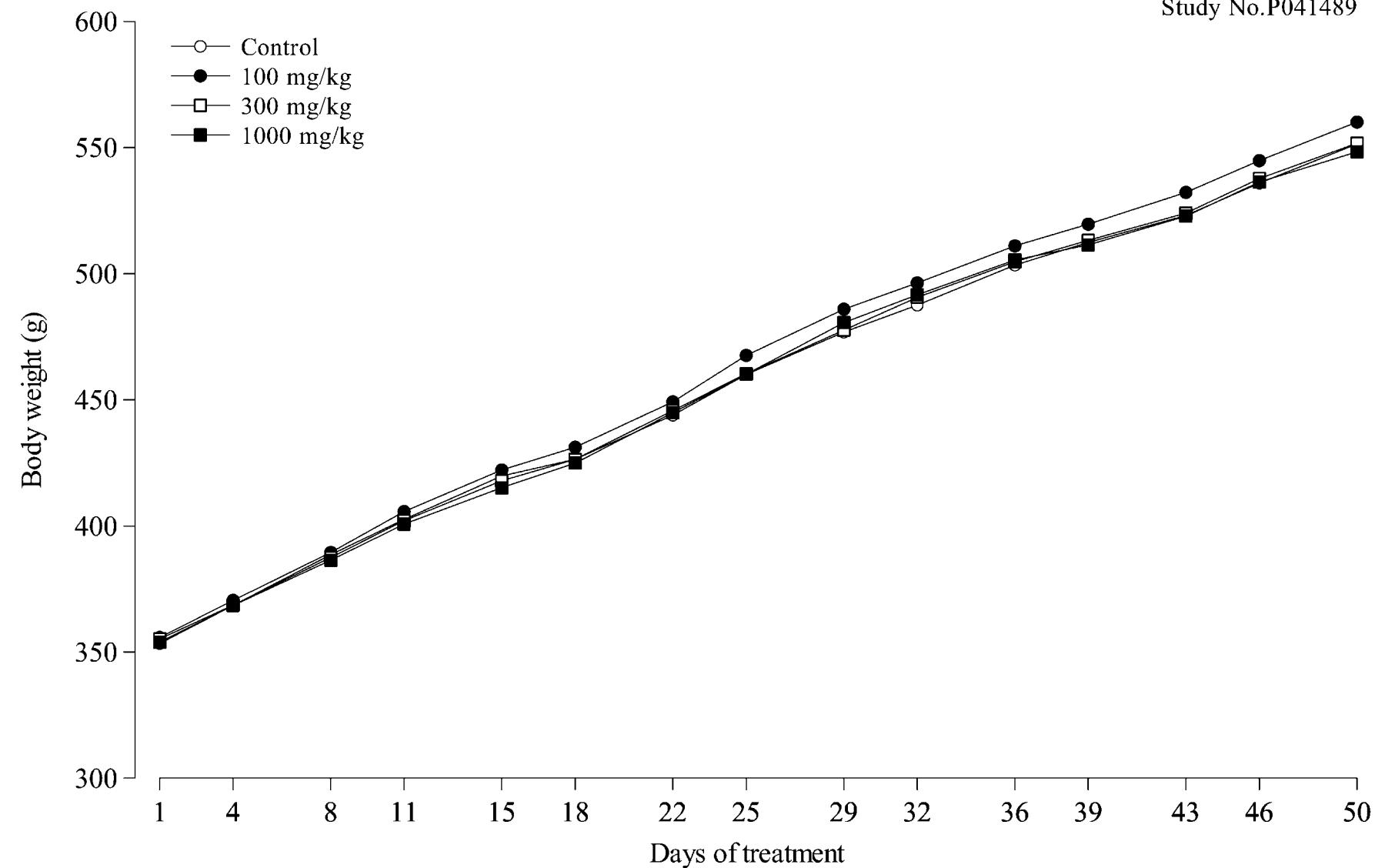


Fig.1 Mean body weight changes of male rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.

Study No.P041489

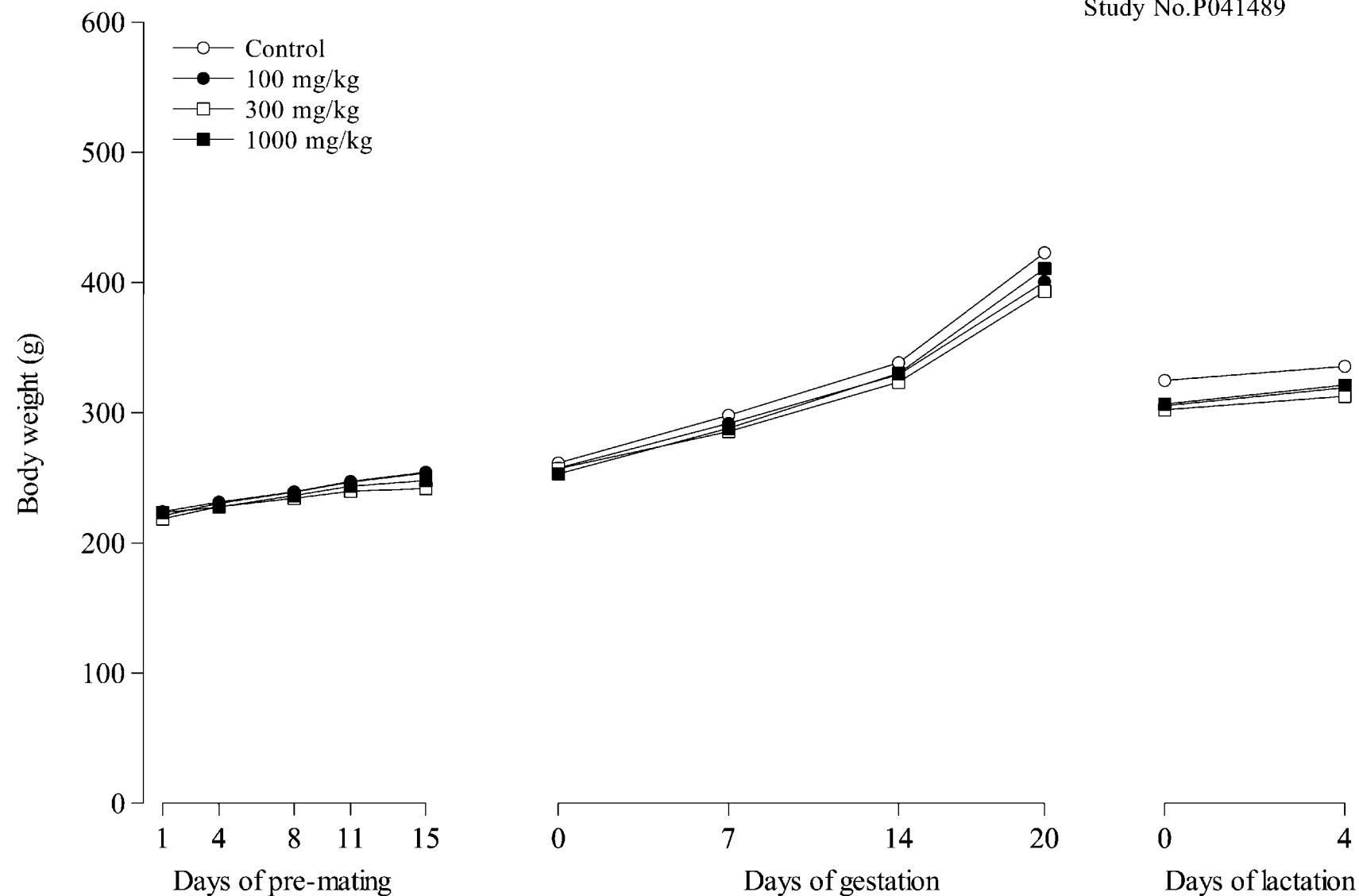


Fig.2 Mean body weight changes of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.

Study No.P041489

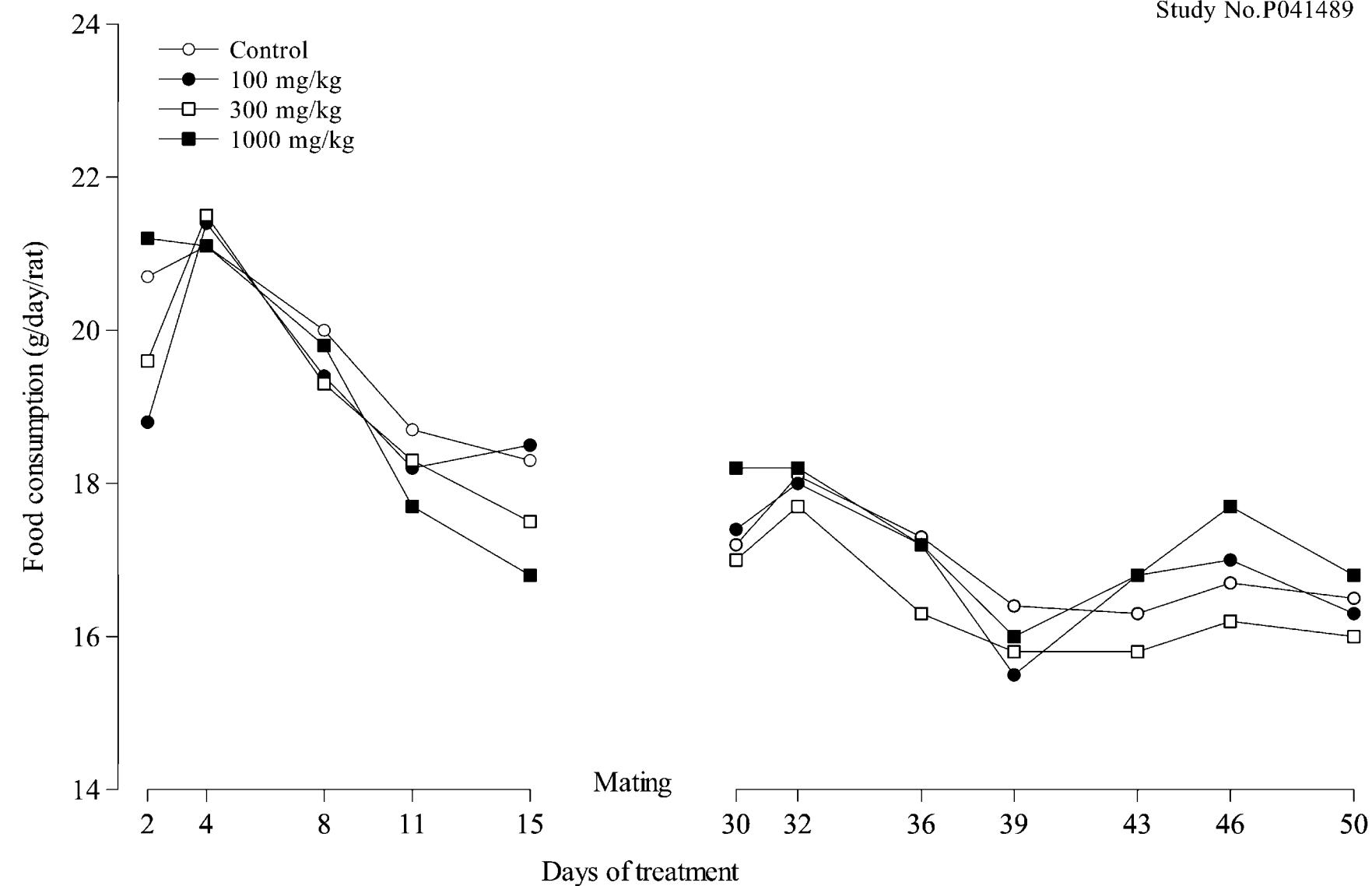


Fig.3 Mean food consumption of male rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.

Study No.P041489

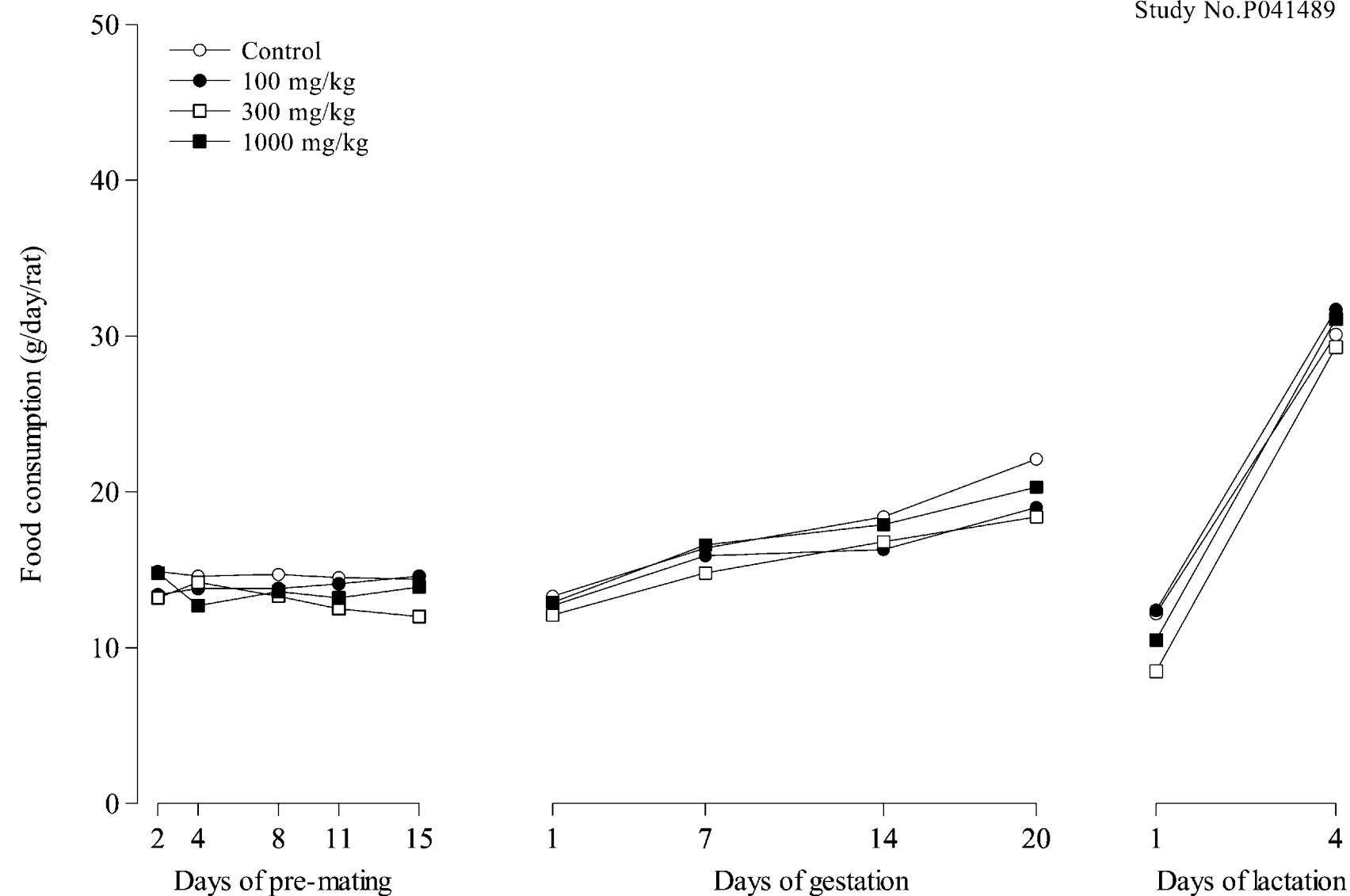


Fig.4 Mean food consumption of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test.

Table 1 Clinical signs of male rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
300 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1000 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Table 1 - continued Clinical signs of male rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment																		
		18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
300 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1000 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Table 1 - continued Clinical signs of male rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment													
		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
300 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1000 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Table 2 Clinical signs of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	3
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	3
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	3
	No abnormality	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	3
300 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	8
	No abnormality	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	8
1000 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	2
	No abnormality	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	2

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment							
		19	20	21	22	23	24	25	26
Control	Number of examined	2	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	2	0	0	0	0	0	0	0
100 mg/kg	Number of examined	1	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	1	0	0	0	0	0	0	0
300 mg/kg	Number of examined	5	2	2	2	2	2	2	2
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	5	2	2	2	2	2	2	2
1000 mg/kg	Number of examined	0	0	0	0	0	0	0	0
	No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stool mixed with a test article-like material	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of gestation															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Control	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Stool mixed with a test article-like material	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
300 mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	Stool mixed with a test article-like material	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
1000 mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	Stool mixed with a test article-like material	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11

Each 1 animal (Control, 300 and 1000 mg/kg) were non-pregnant.

Table 2 - continued Clinical signs of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of gestation						Days of lactation				
		18	19	20	21	22	23	0	1	2	3	4
Control	Number of examined	11	11	11	11	11	2	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11	2	11	11	11	11	11
100 mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	5	12	12	12	12	12
	Stool mixed with a test article-like material	12	12	12	12	12	5	12	12	12	12	12
300 mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	5	11	11	11	11	11
	Stool mixed with a test article-like material	11	11	11	11	11	5	11	11	11	11	11
1000 mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	2	11	11	11	11	11
	Stool mixed with a test article-like material	11	11	11	11	11	2	11	11	11	11	11

Each 1 animal (control, 300 and 1000 mg/kg) were non-pregnant.

Table 3 Body weights of male rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control			100 mg/kg			300 mg/kg			1000 mg/kg			
Days of treatment		Body weight (g)												
		1	353.4± 14.9	(12)	355.8± 16.8	(12)	355.2± 15.1	(12)	353.9± 14.3	(12)	368.5± 16.6	(12)	388.6± 20.9	(12)
1	353.4± 14.9	(12)	355.8± 16.8	(12)	355.2± 15.1	(12)	353.9± 14.3	(12)	353.9± 14.3	(12)	368.5± 16.6	(12)	388.6± 20.9	(12)
4	368.5± 16.2	(12)	370.5± 20.1	(12)	368.6± 15.7	(12)	368.5± 16.6	(12)	368.5± 16.6	(12)	368.5± 16.6	(12)	386.4± 20.9	(12)
8	388.6± 18.7	(12)	389.5± 23.5	(12)	387.5± 19.3	(12)	386.4± 20.9	(12)	386.4± 20.9	(12)	386.4± 20.9	(12)	402.6± 21.3	(12)
11	402.6± 21.0	(12)	405.7± 25.4	(12)	402.1± 21.9	(12)	400.7± 21.3	(12)	400.7± 21.3	(12)	415.2± 23.9	(12)	419.8± 23.7	(12)
15	419.8± 23.7	(12)	422.2± 29.4	(12)	417.9± 23.9	(12)	415.2± 23.9	(12)	415.2± 23.9	(12)	424.9± 24.7	(12)	426.4± 22.9	(12)
18	426.4± 22.9	(12)	431.2± 29.3	(12)	426.4± 26.5	(12)	424.9± 24.7	(12)	424.9± 24.7	(12)	444.9± 27.8	(12)	443.9± 24.9	(12)
22	443.9± 24.9	(12)	449.2± 32.9	(12)	445.7± 26.9	(12)	444.9± 27.8	(12)	444.9± 27.8	(12)	460.1± 29.4	(12)	460.0± 25.8	(12)
25	460.0± 25.8	(12)	467.6± 34.3	(12)	460.3± 29.5	(12)	460.1± 29.4	(12)	460.1± 29.4	(12)	477.6± 32.2	(12)	476.8± 26.2	(12)
29	476.8± 26.2	(12)	485.9± 38.0	(12)	477.6± 32.2	(12)	480.6± 31.9	(12)	480.6± 31.9	(12)	490.6± 34.0	(12)	487.5± 28.0	(12)
32	487.5± 28.0	(12)	496.3± 39.2	(12)	490.6± 34.0	(12)	491.6± 34.0	(12)	491.6± 34.0	(12)	504.7± 35.2	(12)	503.4± 29.1	(12)
36	503.4± 29.1	(12)	511.0± 42.6	(12)	504.7± 35.2	(12)	505.4± 36.5	(12)	505.4± 36.5	(12)	513.2± 38.2	(12)	512.4± 31.2	(12)
39	512.4± 31.2	(12)	519.6± 43.9	(12)	513.2± 38.2	(12)	511.4± 37.3	(12)	511.4± 37.3	(12)	524.0± 42.0	(12)	523.1± 31.7	(12)
43	523.1± 31.7	(12)	532.2± 46.5	(12)	524.0± 42.0	(12)	522.8± 39.2	(12)	522.8± 39.2	(12)	537.7± 44.0	(12)	535.9± 35.4	(12)
46	535.9± 35.4	(12)	544.8± 47.2	(12)	537.7± 44.0	(12)	536.3± 40.2	(12)	536.3± 40.2	(12)	551.7± 45.2	(12)	551.4± 34.5	(12)
50	551.4± 34.5	(12)	560.1± 50.0	(12)	551.7± 45.2	(12)	548.3± 43.2	(12)	548.3± 43.2	(12)				

Not significantly different from control.

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

Table 4 Body weights of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control			100 mg/kg			300 mg/kg			1000 mg/kg		
Days of treatment		Body weight (g)											
1		220.8±	12.8	(12)	224.0±	10.4	(12)	218.5±	10.0	(12)	223.3±	10.2	(12)
4		230.5±	10.3	(12)	231.3±	9.7	(12)	227.8±	12.0	(12)	227.5±	12.3	(12)
8		239.1±	12.5	(12)	239.2±	11.1	(12)	234.3±	12.7	(12)	236.4±	12.1	(12)
11		246.8±	15.1	(12)	247.3±	10.5	(12)	239.7±	14.0	(12)	243.5±	12.0	(12)
15		253.7±	15.7	(12)	254.3±	11.5	(12)	241.8±	16.4	(12)	247.9±	10.2	(12)
18		261.3±	-	(2)	243.1±	-	(1)	251.7±	10.6	(5)			
22								266.5±	-	(2)			
25								270.9±	-	(2)			

Not significantly different from control.

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

Table 4 - continued Body weights of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control			100 mg/kg			300 mg/kg			1000 mg/kg		
		Body weight (g)											
Days of gestation	0	261.4±	20.9	(11)	257.5±	14.3	(12)	257.0±	16.1	(11)	253.0±	11.5	(11)
	7	298.0±	25.4	(11)	291.7±	16.5	(12)	285.5±	15.2	(11)	288.0±	13.6	(11)
	14	338.3±	30.6	(11)	329.2±	17.6	(12)	323.5±	18.8	(11)	330.2±	17.7	(11)
	20	422.8±	41.7	(11)	400.5±	17.2	(12)	393.2±	25.0	(11)	410.6±	23.7	(11)
Days of lactation	0	324.7±	37.0	(11)	305.3±	21.8	(12)	302.2±	17.3	(11)	306.6±	21.5	(11)
	4	335.6±	34.7	(11)	319.2±	17.9	(12)	312.6±	21.7	(11)	321.2±	23.7	(11)

Not significantly different from control.

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

Each 1 animal (Control, 300 and 1000 mg/kg) were non-pregnant.

Table 5 Food consumption of male rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control			100 mg/kg			300 mg/kg			1000 mg/kg		
Food consumption (g/day/rat)													
Days of treatment	2	20.7±	2.7	(12)	18.8±	3.3	(12)	19.6±	2.4	(12)	21.2±	2.1	(12)
	4	21.1±	2.5	(12)	21.4±	3.2	(12)	21.5±	2.3	(12)	21.1±	2.0	(12)
	8	20.0±	1.8	(12)	19.4±	3.2	(12)	19.3±	2.1	(12)	19.8±	1.8	(12)
	11	18.7±	1.7	(12)	18.2±	2.6	(12)	18.3±	2.4	(12)	17.7±	1.5	(12)
	15	18.3±	1.9	(12)	18.5±	2.9	(12)	17.5±	3.1	(12)	16.8±	1.9	(12)
	30	17.2±	1.7	(12)	17.4±	2.6	(12)	17.0±	2.4	(12)	18.2±	2.6	(12)
	32	18.1±	2.0	(12)	18.0±	2.8	(12)	17.7±	2.2	(12)	18.2±	2.9	(12)
	36	17.3±	1.5	(12)	17.2±	2.1	(12)	16.3±	2.5	(12)	17.2±	2.2	(12)
	39	16.4±	1.7	(12)	15.5±	2.1	(12)	15.8±	2.3	(12)	16.0±	3.0	(12)
	43	16.3±	2.0	(12)	16.8±	2.8	(12)	15.8±	2.3	(12)	16.8±	2.6	(12)
	46	16.7±	2.4	(12)	17.0±	1.8	(12)	16.2±	2.7	(12)	17.7±	2.4	(12)
	50	16.5±	1.8	(12)	16.3±	2.2	(12)	16.0±	1.8	(12)	16.8±	2.4	(12)

Not significantly different from control.

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

Table 6 Food consumption of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Control			100 mg/kg			300 mg/kg			1000 mg/kg		
Food consumption (g/day/rat)												
Days of treatment	2	14.9± 1.8	(12)	13.4± 2.7	(12)	13.2± 3.0	(12)	14.8± 2.1	(12)	14.8± 2.1	(12)	
	4	14.6± 2.2	(12)	13.8± 2.4	(12)	14.2± 1.8	(12)	12.7± 3.2	(12)			
	8	14.7± 1.9	(12)	13.8± 2.3	(12)	13.3± 2.2	(12)	13.6± 3.0	(12)			
	11	14.5± 3.0	(12)	14.1± 2.3	(12)	12.5± 2.4	(12)	13.2± 1.8	(12)			
	15	14.4± 2.3	(12)	14.6± 1.9	(12)	12.0± 3.8	(12)	13.9± 2.0	(12)			

Not significantly different from control.

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

Table 6 - continued Food consumption of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose		Control			100 mg/kg			300 mg/kg			1000 mg/kg		
Food consumption (g/day/rat)													
Days of gestation	1	13.3±	2.4	(11)	12.7±	1.9	(12)	12.1±	2.0	(11)	12.9±	1.6	(11)
	7	16.4±	3.3	(11)	15.9±	2.8	(12)	14.8±	2.2	(11)	16.6±	1.8	(11)
	14	18.4±	2.6	(11)	16.3±	2.5	(12)	16.8±	2.2	(11)	17.9±	1.8	(11)
	20	22.1±	2.8	(11)	19.0±	2.3*	(12)	18.4±	2.0**	(11)	20.3±	2.8	(11)
Days of lactation	1	12.2±	5.8	(11)	12.4±	7.1	(12)	8.5±	4.4	(11)	10.5±	6.4	(11)
	4	30.1±	3.9	(11)	31.7±	5.4	(12)	29.3±	3.5	(11)	31.1±	8.0	(11)

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

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

Each 1 animal (Control, 300 and 1000 mg/kg) were non-pregnant.

Table 7 Necropsy findings of male rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings	Sex	Male			
		Control	100 mg/kg	300 mg/kg	
	Group and dose			1000 mg/kg	
	Number of animals	12	12	12	12
All organs and tissues		NR	NR	NR	NR

NR: no remarkable changes

Table 8 Necropsy findings of F0 dams treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings	Sex	Female			
		Control	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
	Group and dose	Number of dams	11	12	11
All organs and tissues		NR	NR	NR	NR

NR: no remarkable changes

Each 1 animal (Control, 300 and 1000 mg/kg) were non-pregnant.

Table 9 Necropsy findings of female rats treated orally with C.I.Pigmrnt Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test
-Non-pregnant

Organs and findings	Group and dose	Control	300 mg/kg	1000 mg/kg
		Animal No.	53	86
All organs and tissues		NR	NR	NR

NR: no remarkable changes.

Table 10 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Control	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Absolute organ weights				
Final body weight (g)	551.4±34.5	560.1±50.0	551.7±45.2	548.3±43.2
Epididymides (g)	1.28±0.17	1.36±0.08	1.27±0.11	1.28±0.13
Testes (g)	3.36±0.35	3.38±0.24	3.39±0.43	3.41±0.33
Relative organ weights				
Epididymides (g/100 gB.W.)	0.23±0.03	0.25±0.03	0.23±0.03	0.24±0.02
Testes (g/100 gB.W.)	0.61±0.07	0.61±0.06	0.62±0.09	0.62±0.05

Not significantly different from control.

Values are mean±S.D.

Table 11 Absolute and relative organ weights of F₀ dams treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Control	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of dams	11	12	11	11
Absolute organ weights				
Final body weight (g)	335.6±34.7	319.2±17.9	312.6±21.7	321.2±23.7
Ovaries (mg)	100.6±14.8	96.2±13.1	93.5±10.7	99.1±14.6
Relative organ weights				
Ovaries (mg/100 gB.W.)	30.0±3.1	30.2±4.2	30.0±3.7	31.1±5.3

Not significantly different from control.

Values are mean±S.D.

Each 1 animal (Control, 300 and 1000 mg/kg) were non-pregnant.

Table 12 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test-Non-pregnant

Group and dose	Animal No.	Final body weight (g)	Ovaries (mg)
Control	53	287.3	84.1
300 mg/kg	86	279.6	87.0
1000 mg/kg	97	301.8	92.0

Table 12 - continued

Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test-Non-pregnant

Group and dose	Animal No.	Ovaries (mg/100 gB. W.)
Control	53	29.3
300 mg/kg	86	31.1
1000 mg/kg	97	30.5

Table 13 Histopathological findings of male rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings \ Sex	Group and dose	Male			
		Control	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
		Number of animals	12	12	12
Genital system					
Testis		(12)	(0)	(1)	(12)
Atrophy, seminiferous tubule		1		1	0
Epididymis		(12)	(0)	(1)	(12)
Granuloma, spermatic		0		0	1

Not significantly different from control.

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

Table 14 Histopathological findings of F₀ dams treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organs and findings	Sex	Female				
		Group and dose	Control	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
			Number of dams	11	12	11
Genital system						
Ovary			NR(11)	(0)	(0)	NR(11)

Not significantly different from control.

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

Each 1 animal (Control, 300 and 1000 mg/kg) were non-pregnant.

Table 15 Histopathological findings of female rats treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test
-Non-pregnant

Organs and findings \ Group and dose	Control	300 mg/kg	1000 mg/kg
	Animal No.	53	86
Genital system			
Ovary	NR	NR	NR

NR; no remarkable changes.

Table 16 Reproductive performance of rats treated orally with C.I. Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Control	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of females examined	12	12	12	12
Count of estrus ^{a)}	3.92 ± 0.51	3.42 ± 0.67	3.92 ± 0.29	3.50 ± 0.52
Estrous cycle ^{b)}	4.08 ± 0.29	4.15 ± 0.31	4.15 ± 0.28	4.08 ± 0.21
No. of mated				
Male	12	12	12	12
Female	12	12	12	12
No. of copulated ^{c)}				
Male	12(100)	12(100)	12(100)	12(100)
Female	12(100)	12(100)	12(100)	12(100)
No. of impregnated ^{d)}	11(91.67)	12(100)	11(91.67)	11(91.67)
No. of pregnant ^{c)}	11(91.67)	12(100)	11(91.67)	11(91.67)
Duration of mating ^{b)}	2.25 ± 0.97	2.08 ± 0.90	4.17 ± 3.33	1.50 ± 0.80

Not significantly different from control.

a) Values are mean±S.D.

b) Values are mean±S.D. (day)

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

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

Table 17 Terminal delivery of F₀ dams treated orally with C.I.Pigment Orange 16 in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group and dose	Control	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of dams	11	12	11	11
No. of corpora lutea ^{a)}	15.55 ± 1.21	15.33 ± 1.67	15.36 ± 3.20	17.45 ± 3.70
No. of implantations ^{a)}	15.09 ± 1.14	14.58 ± 1.51	13.82 ± 1.54	15.27 ± 1.56
Implantation index ^{b)}	97.08	95.11	89.94	87.50
Gestation index ^{c)}	100	100	100	100
No. of dams with live newborns	11	12	11	11
Gestational days ^{a)}	22.18 ± 0.40	22.42 ± 0.51	22.45 ± 0.52	22.18 ± 0.40
No. of newborns ^{a)}	14.09 ± 1.64	13.50 ± 2.07	12.73 ± 1.49	14.45 ± 1.21
No. of stillborns ^{d)}				
Male	1	2	1	0
Female	1	3	0	0
Total	2 (1.29)	5 (3.09)	1 (0.71)	0
No. of live newborns ^{a)}	13.91 ± 1.51	13.08 ± 2.50	12.64 ± 1.36	14.45 ± 1.21
Birth index ^{e)}	92.17	89.71	91.45	94.64
Sex ratio of live newborns ^{f)}	1.19(83 / 70)	0.94(76 / 81)	0.81(62 / 77)	0.99(79 / 80)
Body weight of live newborns (g) ^{a)}				
Male on day 0	6.7 ± 0.5	6.9 ± 0.8	6.8 ± 0.5	6.5 ± 0.5
on day 4	10.4 ± 1.0	10.8 ± 1.7	10.3 ± 1.0	9.6 ± 1.5
Female on day 0	6.2 ± 0.6	6.7 ± 0.8	6.5 ± 0.5	6.1 ± 0.5
on day 4	9.9 ± 1.3	10.3 ± 1.6	9.9 ± 1.0	9.0 ± 1.6
Viability index ^{g)}	99.35	100	99.28	97.48
No. of external anomalies	0	0	0	0

a) Values are mean±S.D.

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

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

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

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

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

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

Each 1 animal (Control, 300 and 1000 mg/kg) were non-pregnant.