試験番号:R-08-007

最終報告書

N,N'-ジフェニル-p-フェニレンジアミン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番地

TEL　0463-82-4751

目次

要約 6
1. 親動物所見 6
1-1. 一般毒性学的変化 6
1-2. 生殖発生毒性学的変化 6
2. 次世代に対する影響 6

材料と方法 7
1. 被験物質 7
2. 動物および飼育方法 8
3. 投与検体 9
1)調製 9
2)安定性試験 9
3)含量および均一性の確認 9
4. 投与量の設定および投与方法 10
5. 検査法 11
1)親動物(F_0) 11
2)出生児(F_1) 13
6. データの解析法 13

試験成績 14
1. 親動物 14
1)一般状態 14
2)体重 15
3)体重増加量 15
4)体重累積増加量 15
5)摂餌量 15
6)器官重量 15
7)剖検所見 15
8)病理組織所見 15

2. 生殖能力 16
1)性周期および交配成績 16
2)出産率および妊娠期間 16
3)分娩および哺育状態 16
4)黄体数、着床数および着床率 16
3. 出生児 16
1)生存 16
2)体重 16
3)出生児観察 16
考察 17
参考文献 18

Table 1～21 23

要約

今回、N,N'-ジフェニル-p-フェニレンジアミン(以下、DPPD と略す)の母動物に対する影響および新生児の発育に及ぼす影響を検討する目的により、DPPD を 0、8、50 ならびに 300 mg/kg の用量で、雌雄の Crl:CD(SD)ラットに強制経口投与した。雌雄動物は、投与 14 日から交配させ、雄動物は 42 日間投与した後に剖検した。雌動物は交配後、妊娠期間を通して投与を行い、自然分娩させて母動物および出生児は哺育 5 日に剖検した。投与は哺育 4 日まで行った。その結果を以下に要約した。

1. 親動物所見

雄動物では、死亡動物は観察されず、一般状態、体重推移、摂餌量、器官重量、剖検所見および病理組織所見には DPPD 投与による影響は認められなかった。

雌動物では、体重推移、餌摂量および器官重量に DPPD 投与による影響は認められなかった。また、被験物質の影響と考えられる分娩遅延が認められ、50 mg/kg 以上の投与群では平均妊娠期間が有意に延長した。300 mg/kg 投与群の 3 例で妊娠末期に体表温低下、蒼白、立毛が観察され、1 例では死亡し、別の 1 例では安楽死させた。また、1 例では妊娠 23 日に分娩が終了したが、翌日全出生児が死亡し、安楽死させた。死亡例および切迫屠殺例の剖検所見では、子宮内に出血、胸水の貯留、肺に退縮不全および赤色化、腎臓に硬化および髄質の暗赤色化、腺胃粘膜に赤色物の付着、十二指腸の粘膜に赤色の陥凹部が観察され、病理組織所見では腎臓の近位尿細管上皮の壊死/変性、好塩基性尿細管が認められたほか、子宮の内膜に出血、肺の水腫、肺胞内に泡沫細胞の集簇および毛細血管に繊維素性の血栓、腺胃および十二指腸の粘膜に出血を伴うびらんが観察された。性周期、交配成績、出産率、黄体数、着床数および着床率には、DPPD 投与による影響はみられなかった。分娩遅延を示した動物以外の体重推移、摂餌量および器官重量に DPPD 投与による影響は認められなかった。

1-1. 一般毒性学的変化

本試験において体重や一般状態、剖検所見等、一般毒性学的な観察項目に被験物質投与の影響はみられなかったものの、300 mg/kg の投与によって引き起こされた死亡に一般毒性学的影響が全く関与していないとは言い切れないことから、一般毒性学的無毒性量は 50 mg/kg と推定した。

1-2. 生殖発生毒性学的変化

DPPD の 300 mg/kg の投与によって分娩障害等の所見がみられ、50 mg/kg の投与によっても妊娠期間の延長が認められることから、その生殖・発生毒性学的無毒性量は 8 mg/kg と推定した。

2. 次世代に対する影響

児に対する影響は認められないことから、次世代に対する無影響量は 300 mg/kg と推定された。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である N,N'-ジフェニル-p-フェニレンジアミン〔CAS No.:74-31-7、分子式:$C_{18}H_{16}N_2$、分子量:260.36、物理化学的性質(性状:ほとんど白色の結晶性粉末、アセトン溶状:澄明、融点:153.2℃、乾燥減量:0.03%、含量(HPLC):100.0%、含量(GC):100.0%、定性(IR):試験適合)、

購入し、2009 年 1 月 29 日に受領後、2009 年 6 月 1 日まで被

験物質受領保管室に室温(実測値 16.1～24.2℃)で保管した。また、2009 年 6 月 1 日から 2009 年 7 月 14 日まで被験物質保管室 2 にて室温(実測値 18.5～22.1℃)で保管した。

また、本被験物質を用いる試験(試験番号:Q-08-021、R-08-006、R-08-007)に使用したものと同一ロットの被験物質について、GLP 基準の確認ではないが、購入元にて被験物質入手前ならびに動物実験終了後に品質検査を実施し、測定結果に変化がないことを確認した(Annex A-1～Annex A-2)。

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 系〔Crl:CD(SD)、SPF〕ラット雄 62 匹、雌 73 匹を購入し、7 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油性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、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時に体重を測定した。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	:2009 年 5 月 20 日
入荷時体重	:雄 264.5 ～ 300.3 g、雌 164.2 ～ 200.0 g
検疫終了日	:2009 年 6 月 2 日
検疫終了時体重	:雄 370.2 ～ 446.9 g、雌 220.4 ～ 265.2 g

検疫・馴化の結果、入荷した全ての動物において、検疫期間中の一般状態および体重推移に異常は認められなかった。雌動物で規則的な性周期の回帰が認められない 2 匹を除外し、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動物番号を標識し、群ごとに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 10 匹、雌動物 19 匹および性周期の結果により除外した 2 匹は全て余剰動物とし、雄動物 3 匹は定期病原性微生物検査に使用し、残りの雄動物 7 匹および雌動物 21 匹は他の基礎的検討(試験番号:S-09-016)に移管した。

動物は許容温度 21.0～25.0℃、許容湿度 40.0～75.0%、換気回数約 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/ケージ)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 5 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(日本エスエルシー株式会社)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 21.5～23.5℃、湿度の実測値は 47.0～67.0% であった。

使用した各ロットの飼料については混入物の化学分析を財団法人東京顕微鏡院で、微生物学的検査

および組成分析を日本クレア株式会社で実施し、その成績を秦野研究所における標準操作手順書に基づいて検討・確認した結果、試験に支障を来すような異常は認められなかった。また、秦野研究所で水質検査を定期的に実施し(4 回/年)、その成績を水道法に基づく水質基準に従って検討・確認した結果、試験に支障を来すような異常は認められなかった。床敷の混入物については、年 2 回、社団法人浜松市薬剤師会浜松環境衛生研究所で実施し、秦野研究所における標準操作手順書に従って確認した結果、異常は認められなかった。

3. 投与検体

1)調製

被験物質を秤量し、乳鉢で磨砕後、0.5% カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液〔CMC Na、丸石製薬株式会社(日局カルメロースナトリウム、製造番号:7213)を日局注射用水(光製薬株式会社、製造番号:A89AA1)で溶解〕を加えて懸濁状態とし、6.00 w/v% 懸濁液を調製した。これを媒体で段階希釈し、1.00 および 0.160 w/v% 懸濁液を調製し、滅菌済の気密容器に分注した。調製した検体は冷蔵・遮光下で保管し(機器番号 X-A-2、実測値 2～7℃、保管期間 2009 年 6 月 2 日から 7 月 21 日)、調製後 8 日以内に使用した。

2)安定性試験

本被験物質を用いる試験のための投与検体中の安定性試験(試験番号:Q-08-021)として調製濃度 200 mg/mL および 0.128 mg/mL について、冷蔵、遮光条件下における 8 日間の安定性を確認した(Annex B)。

3)含量および均一性の確認

本試験の初回調製検体について、被験物質含量および均一性を確認した。含量および均一性の判定基準は、平均含量が調製濃度の 85.0～115%、また各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0～110% 以内とした。2009 年 6 月 2 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 91.5～101% であり、ばらつきも各測定値が平均含量の 98.9～101% で規定範囲内にあったことを確認した(Annex C)。

調製検体中の DPPD 濃度は以下の方法で測定した。

①標準溶液の調製

被験物質約 10 mg を精密に量り、メタノールに溶解して正確に 10 mL とし標準原液(約 1 mg/mL)を調製した。この標準原液をメタノールで希釈(1→50)して標準溶液(20 μg/mL)を、さらにこの標準溶液をメタノールで希釈(1→20、1→10、5→20)し、標準溶液(1、2 および 5 μg/mL)を調製した。

②検量線試料の調製

①の標準溶液(1、2、5 および 20 μg/mL)を③の条件下で測定した。各溶液はそれぞれ 3 回測定した。得られる DPPD のピーク面積と DPPD の調製濃度を基に、最小二乗法により検量線を作成した。

③調製検体中濃度測定法

調製検体 6.00 w/v%(60.0 mg/mL)の 0.5 mL をとり、メタノール(以下、MeOH)を加えて溶かし、

MeOH で正確に 100 mL とした。この溶液の 1 mL をとり、MeOH を加えて正確に 50 mL とし、試料溶液(6.00 μg/mL)を調製した。調製検体 1.00 w/v%(10.0 mg/mL)の 0.5 mL をとり、MeOH を加えて溶かし、MeOH で正確に 100 mL とした。この溶液の 2 mL をとり、MeOH を加え正確に 10 mL とし、試料溶液(10.0 μg/mL)を調製した。また、調製検体 0.160 w/v%(1.60 mg/mL)の 0.5 mL をとり、MeOH を加えて溶かし、MeOH で正確に 100 mL とし、試料溶液(8.00 μg/mL)を調製した。サンプリングは各調製検体よりかき混ぜながら n=3 で採取した。以下に示した HPLC 条件下で、各試料溶液につき n=1 で測定した。得られる DPPD のピーク面積から検量線を用いて試料溶液中の DPPD 濃度を求め、希釈率を乗じて調製検体中の DPPD 濃度を算出した。

HPLC 条件

HPLC システム構成	LC-10AD(ポンプ)、SIL-10A$_{XL}$(オートインジェクタ)、CTO-10A(カラムオーブン)、SPD-10A(検出器)、SCL-10A(システムコントローラ)、DGU-20A$_3$(デガッサ)、C-R7A plus(データ処理装置)
分析カラム	Inertsil ODS-3 (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm)、ジーエルサイエンス㈱
移動相	メタノール/水混液(80:20(v/v))
流量	1.0 mL/min
カラム設定温度	40℃
測定波長	300 nm
試料注入量	5 μL
オートインジェクタ洗浄液	90 v/v% メタノール
システム適合性	測定開始前後に標準溶液(5 μg/mL)を 1 回ずつ測定し、DPPD のピーク保持時間およびピーク面積の変動を調べ、測定前後の偏差%はピーク保持時間が±3%以内、ピーク面積が±5% 以内であることを確認した。

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[421]に拠り、ラット用胃管による強制経口投与とした。

本試験の投与量は予備試験(試験番号:R-08-006)の結果をもとに設定した。すなわち、DPPD の 1000 mg/kg あるいは 16 mg/kg を雌動物の各 3 例に交配前 2 週間から分娩後 3 日まで投与した結果、1000 mg/kg 投与群で分娩遅延がみられ、1 例は死亡し、同群の他の 2 例は切迫屠殺した。これらの動物の外表所見では外陰部の出血が認められ、貧血様を呈していた。剖検の結果、子宮腔内の出血、胸腺の小型化、腎臓の大型化、淡色化、副腎の大型化および脾臓の小型化が認められた。これらのことから、1000 mg/kg は妊娠動物に対する最大耐量を凌駕する量と考えられた。一方、文献 [1]において、より低用量である 13 mg/kg の投与により分娩遅延の発現が報告されている 16 mg/kg 投与群にあっては、

妊娠期間の延長は明確ではなかった。以上の試験結果ならびに文献の成績から、本試験の高用量には最大耐量を凌駕した 1000 mg/kg の 3 分の 1 量である 300 mg/kg を設定し、公比約 6 として中用量を 50 mg/kg、低用量をこの予備試験において被験物質による影響が明らかではなかった 16 mg/kg の半分量である 8 mg/kg に設定した。

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(5 日間)を通して剖検前日まで(総投与回数 42 回)、経口的に 1 日 1 回、1 週 7 回、9 時 5 分～11 時 50 分の間に投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、雄および交配前ならびに交配中の雌では週 1 回測定する体重を基に、交尾が確認された雌では、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 CMC Na 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	CMC Na	0	0	5	MX01001～MX01013	FB01001～FB01013
2	DPPD	8	0.160	5	MX02001～MX02013	FB02001～FB02013
3	DPPD	50	1.00	5	MX03001～MX03013	FB03001～FB03013
4	DPPD	300	6.00	5	MX04001～MX04013	FB04001～FB04013

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 回以上、その他の飼育期間中は毎日 1 回、観察した。

②体重測定

雄動物は、投与 1、7、14、21、28、35、42 日および剖検日に測定した。雌動物は投与 1、7、14、21 日、妊娠 0、7、14、21 日ならびに哺育 0、4 日および剖検日に、さらに妊娠 25 日相当日までに分娩が確認されなかった動物では妊娠 26 日相当日にも測定した。瀕死屠殺例は剖検日、死亡例は発見時に体重を測定した。

③摂餌量測定

雄動物は、投与 1～2、7～8、13～14、29～30、35～36、41～42 日に測定した。雌動物は、投与 1～2、7～8、13～14 日および妊娠 0～1、7～8、14～15、20～21 日ならびに哺育 3～4 日に測定した。

④性周期観察

各群とも全例の雌について、動物入荷翌日から性周期を観察し、群分け後投与開始以降も引き続き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 14 日の 16 時 10 分より同群内の雌雄を 1 対 1 で同居させた。翌朝より毎朝、腟栓を確認し、同居中の雌の腟垢標本を作製して鏡検した。腟内に腟栓あるいは腟垢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 日と起算して同居を解消し、個別に飼育した。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。

⑥妊娠・分娩・哺育状態の観察

8 mg/kg 投与群の 1 例および 300 mg/kg 投与群の 2 例を除く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 1～5 日の間、毎日観察した。分娩した全例の妊娠期間(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、哺育 5 日目の剖検時に観察した着床数および妊娠黄体数から着床率[(着床数/妊娠黄体数)×100,%]を算出した。

⑦剖検および病理組織学的検査

雄動物は、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、精巣および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)、前立腺、精嚢および乳腺は 0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に固定し、精巣および精巣上体は対照群および 300 mg/kg 投与群について、病理組織学的検査を実施した。

雌動物のうち、死亡動物は発見後、速やかに剖検し、卵巣、子宮、膣、乳腺、下垂体、副腎、肺、腎臓、胃、肝臓、心臓、脳を摘出し、0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に固定した。事故による 50 mg/kg 投与群の切迫屠殺動物はペントバルビタール麻酔下で放血致死させて剖検し、卵巣、子宮、膣、乳腺、胃を 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定した。300 mg/kg 投与群の切迫屠殺動物は、ペントバルビタールで胎児を麻酔した条件下に、セボフルラン麻酔した母動物から無処置注射筒を用いて採血後、放血致死させて剖検し、卵巣、子宮、膣、乳腺、下垂体、副腎、腎臓、肺、胃および十二指腸を摘出し、卵巣については重量を測定した。摘出器官は、0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に保存した。

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、卵巣重量を測定した。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。未分娩であった雌動物は着床の有無を再確認した。また、乳腺、子宮、膣および卵巣は

0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定し、卵巣は対照群および 300 mg/kg 投与群について、病理組織学的検査を実施した。また、雌雄とも、剖検時に異常の認められた器官についても 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定し、病理組織学検査を実施した。

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 1～5 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 5 日に外表奇形の有無を観察してセボフルラン吸入により致死させて剖検し、内部器官の異常の有無を観察した。

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、300 mg/kg 投与群と対照群との間の有意差検定を行った(有意水準:5%)。ただし、雌においては、哺育第 5 日に解剖した例以外は検定から除外した。

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%)を行い、分散が一様である場合には、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 2, Appendix 1-1～Appendix 1-4, Appendix 2-1～Appendix 2-4)

雄動物では死亡動物は観察されず、一般状態に異常はみられなかった。

雌動物では、300 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 FB04011)において分娩遅延がみられた。この動物では妊娠 23 日の朝、2 匹の児を娩出していたが、体表温低下、蒼白、立毛が観察され、耐え難い苦痛を感じているものと判断した。この動物については切迫屠殺することを決断したが、決断直後、剖検準備中に死亡が確認された。300 mg/kg 投与群の他の 2 例においても妊娠 22 日になっても分娩が完了せず、1 例(動物番号 FB04010)は妊娠 22 日の昼、膣口からの出血が確認された。この動物では翌日、妊娠 23 日の朝に 4 匹の児を娩出していたが、体表温低下、蒼白、立毛が観察されたため切迫屠殺した。別の 1 例(動物番号 FB04007)では妊娠 22 日までは分娩の徴候はみられず、妊娠 23 日の朝から蒼白、立毛が観察された。この動物は妊娠 23 日に分娩が終了したが、哺育 1 日目に全出生児が死亡したため安楽死させた。また、300 mg/kg 投与群の他の 1 例(動物番号 FB04005)では、妊娠 23 日に立毛が観察され、別の 1 例(動物番号 FB04013)では妊娠 22 日に蒼白が観察された。その他、試験期間中の一般状態に異常は観察されなかった。

2)体重 (Table 3,Table 6, Appendix 3-1～Appendix 3-4, Appendix 6-1～Appendix 6-4)

雌雄動物とも、各測定時点における体重には対照群と DPPD 投与群との間に有意差は認められなかった。

3)体重増加量(Table 4,Table 7, Appendix 4-1～Appendix 4-4, Appendix 7-1～Appendix 7-4)

雌雄動物とも、各測定時点における体重増加量には対照群と DPPD 投与群との間に有意差は認められなかった。

4)体重累積増加量(Table 5,Table 8, Appendix 5-1～Appendix 5-4, Appendix 8-1～Appendix 8-4)

雌雄動物とも、各測定時点における体重累積増加量には対照群と DPPD 投与群との間に有意差は認められなかった。

5)摂餌量(Table 9,Table 10, Appendix 9-1～Appendix 9-4, Appendix 10-1～Appendix 10-4)

雌雄動物とも、各測定値における摂餌量には対照群と DPPD 投与群との間に有意差は認められなかった。300 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 FB04005)においては妊娠 8、11、12、15 および 16 日に餌こぼしが観察されたため、妊娠 7～8 および 14～15 日の摂餌量のデータを集計から除外した。

6)器官重量(Table 11, Table 12, Appendix 11-1～Appendix 11-4, Appendix 12-1～Appendix 12-4)

雌雄動物とも、器官重量には、対照群と DPPD 投与群との間に有意差は認められなかった。

7)剖検所見(Table 13,Table 14, Appendix 13, Appendix 14)

雄では、対照群の左側精巣上体の尾部に白色結節が、雌では、50 mg/kg 投与群の腟の漿膜面に黄白色の結節が各 1 例観察された。

一方、分娩遅延で死亡した例では、子宮内に出血、胸水の貯留、肺に退縮不全および赤色化、腎臓に硬化および髄質の暗赤色化、腺胃粘膜に赤色物の付着が観察された。同様に、分娩遅延で切迫屠殺した例では、子宮内に出血、肺に退縮不全および赤色化、十二指腸の粘膜に赤色の陥凹部、腎臓に硬化および髄質の暗赤色化が観察された。

8)病理組織所見(Table 15, Table 16, Appendix 15, Appendix 16)

精巣では、対照群の 1 例の両側に精細管の萎縮が観察され、同様の所見は 300 mg/kg 投与群の 3 例および対照群の 2 例の片側にもみられた。これら異常所見が認められた例のうち、300 mg/kg 投与群の 1 例および対照群の 2 例の精巣上体の管腔に細胞残屑が観察されたほか、対照群の 1 例の片側に精子肉芽腫が認められた。

卵巣では、300 mg/kg 投与群および対照群の全例に、異常所見は観察されなかった。

剖検時、異常所見が認められた 50 mg/kg 投与群の 1 例の腟では、膀胱憩室が腟の漿膜面に固着しているのが観察された。

一方、分娩遅延で死亡した例では、腎臓の髄質外帯に近位尿細管上皮の壊死/変性、皮質に好塩基性尿細管が認められたほか、子宮の内膜に出血、肺で水腫、肺胞内に泡沫細胞の集簇および毛細血管に繊維素性の血栓、腺胃粘膜に出血を伴うびらんが観察された。同様に分娩遅延で切迫屠殺した例では、腎臓の髄質外帯に近位尿細管上皮の壊死/変性、皮質に好塩基性尿細管が認められたほか、肺で水腫、肺胞内に泡沫細胞の集簇および毛細血管に繊維素性の血栓、子宮の内膜に出血、十二指腸の

粘膜に出血を伴うびらんが観察された。また、投与期間中に胃管を飲み込んだため切迫屠殺した例では、腺胃の粘膜に出血を伴うびらんおよび粘膜固有層に水腫が観察された。

2. 生殖能力

1)性周期および交配成績(Table 17, Table 18, Appendix 17-1～Appendix 17-4, Appendix 18-1～Appendix 18-4)

性周期には、DPPD 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。交配の結果、交尾率および受胎率には DPPD 投与の影響はみられなかった。また、交尾までの日数およびその間の発情回数にも、対照群と DPPD 投与群との間に有意差は認められなかった。

2)出産率および妊娠期間(Table 19, Appendix 19-1～Appendix 19-4)

出産率には、対照群と DPPD 投与群との間に有意差は認められなかった。

妊娠期間は、50 mg/kg 以上の投与群で対照群と比較して有意(P＜0.01)に延長した。妊娠期間が 23 日であった動物が対照群で 5 例であったのに対し、8 mg/kg 投与群では 9 例、50 mg/kg 投与群では 12 例認められ、300 mg/kg 投与群では妊娠期間が 23 日であったものが 9 例、24 日であった動物も 1 例認められた。残りの母動物は妊娠 22 日に出産し、出産時の状態に異常は認められなかった。

3)分娩および哺育状態(Table 19, Appendix 19-1～Appendix 19-4)

300 mg/kg 投与群の 3 例(動物番号 FB04007、FB04010 および FB04011)において、ミルクスポット(哺育によって認められる児腹部の白色化)がなく、胎盤が繋がっている出生児がみられたこと、母動物が出生児を集めなかったことから、分娩状態不良と判断した。また、そのうちの 1 例(動物番号 FB04007)においては、分娩終了後に出生児を集めず、哺育 1 日目に全出生児が死亡した。

4)黄体数、着床数および着床率(Table 19, Appendix 19-1～Appendix 19-4)

8 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 FB02006)においては、妊娠 25 日までに分娩が確認されず、剖検の結果、着床が確認されなかったことから不妊であると判断し、妊娠期以降の成績は全て評価対象から除外した。その他、黄体数、着床数および着床率には、対照群と DPPD 投与群との間に有意差は認められなかった。

3. 出生児

1)生存(Table 19, Appendix 19-1～Appendix 19-4)

産児数、分娩率、生児出産率、出産率、出生率、新生児生存率および性比には、対照群と DPPD 投与群との間に有意差は認められなかった。

2)体重(Table 20, Appendix 20-1～Appendix 20-4)

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

3)出生児観察(Table 21)

対照群(動物番号 FB01010 雌 1 匹)および 300 mg/kg 投与群(動物番号 FB04005 雄 1 匹)の出生

児において、哺育 0 日に母動物による咬傷が原因と考えられる右後肢および左前肢の指の切断が観察された。対照群の 1 例においては、哺育 5 日まで生存したが、300 mg/kg 投与群の 1 例は、哺育 1 日目の観察時に不明となっていた。

対照群で雌 1 匹、8 mg/kg 投与群で 6 匹(雄 1 匹、雌 5 匹)、50 mg/kg 投与群で 6 匹(雄 4 匹、雌 2 匹)、300 mg/kg 投与群で 13 匹(雄 6 匹、雌 7 匹)の死亡児が観察されたが、剖検時に異常は観察されなかった。その他、哺育 0～5 日における生存児に外形異常は観察されなかった。

考察

Crl:CD(SD)ラットに DPPD の 8、50 および 300 mg/kg を、雄には 42 日間、雌には交配前 2 週間および交配期間、妊娠期間を通して哺育 4 日まで連日強制経口投与し、雌雄ラットに対する生殖毒性について検討した。

本試験においては、DPPD の 50 mg/kg 以上の用量で妊娠期間の延長が認められ、300 mg/kg 投与群においては分娩遅延と考えられる原因により、死亡あるいは切迫屠殺の必要に迫られた動物がみられた。DPPD は工業用抗酸化剤としてゴムや接着剤の劣化防止等に使用されているが、DPPD の分娩遅延に関する検討は以前から存在する。Marois らによれば妊娠ラットに DPPD の 20 mg/kg を妊娠 17 日から経口投与したとき出産に影響が認められ、同用量を妊娠 14 日から投与した場合は分娩が認められず、さらに投与量を上げて 40 mg/kg を妊娠 14 日から投与した場合には、生存児の減少がみられるとしている [2]。この報告においては、妊娠 21 日にプロスタグランジン $F_2\alpha$ を 200 μg/kg 補給することによって、40 mg/kg を妊娠 14 日から投与した場合に起こる分娩障害が消失したとしており、分娩障害は被験物質によるプロスタグランジン $F_2\alpha$ の合成阻害が分娩障害の原因であろうと推定している [2]。また、Fujita ら [3]、Fujimoto らによるウサギ腎スライス標本を用いた検討においては [4]、DPPD や sodium diethyl dithiocarbamate は、腎スライス標本によるプロスタグランジンEの合成を減少させたとする報告が認められる。プロスタグランジン $F_2\alpha$、プロスタグランジン E_2 などは分娩時にその子宮における平滑筋収縮作用が児の娩出に必須であることを考えると本試験で認められた分娩遅延は被験物質によるプロスタグランジン合成抑制がその主たる原因であると考えられる。

この他、一般状態、体重推移、摂餌量、器官重量、剖検所見および病理組織所見には変化は認められなかった。DPPD は、アニリンが重合した構造を持つことからメトヘモグロビン血症を引き起こす可能性が推測され、あるいはプロスタグランジン合成抑制作用を持ち NSAID 類似の抗炎症作用が期待されることから [5]、消化管障害、肝障害、腎障害等を引き起こす可能性も考えられたが、本試験の投与量ではこうした作用は認められなかった。一方、分娩が遅延した動物においては子宮内に血液の貯留がみられたが、こうした所見はプロスタグランジンの多くが血管拡張による血圧低下作用を有することを考えると分娩障害が一概にプロスタグランジンによる作用だけではない可能性も示唆するものと考えられた。また、分娩時にみられた母動物の一般状態の悪化、死亡等の所見も分娩遅延による影響だけと断言することはできない。

以上の結果、DPPD の 300 mg/kg の投与によって分娩障害等の所見がみられ、50 mg/kg の投与によっても妊娠期間の延長が認められることから、その生殖・発生毒性学的無毒性量は 8 mg/kg、本試験において体重や一般状態、剖検所見等、一般毒性学的な観察項目に被験物質投与の影響はみられないものの、300 mg/kg の投与によって引き起こされた死亡等に一般毒性学的影響が全く関与していないとは言い切れないことから、一般毒性学的無毒性量は 50 mg/kg、児に対する無影響量は 300 mg/kg と推定された。

参考文献

1) Oser, B.L., Oser, M.: Feed antioxidants, inhibitory effect of feed grade diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD) of parturition in rats. J. Agric. Food. Chem. 4: 796-797 (1956)
2) Marois, M.: Antioxidants, prostaglandins and prematurity. Bull. Acad. Natl. Med. 182: 595-597 (1998), in French
3) Fujita, T., Fujimoto, Y., Tanioka, H.,: Antioxidant effect on prostaglandin synthesis in rabbit kidney medulla slices. Experientia 38: 1472-1473 (1982)
4) Fujimoto, Y., Tanioka, H., Toibana, E., et al.: Inhibition of prostaglandin synthesis in rabbit kidney medulla slices by antioxidants. J. Pharm. Pharmacol. 36: 195-197 (1984)
5) Levy, L., Kerley, T.L.: The use of DPPD (N, N'-diphenyl-p-phenylendiamine) as an anti-inflammatory agent. Life Sciences. 14: 1917-1925 (1974)

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

Table 1. Clinical signs of males

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Number of animals	13	13	13	13
Number of animals with abnormality	0	0	0	0

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 2. Clinical signs of females

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Number of animals	13	13	12 *	13
Number of dead animals	0	0	0	1
Number of animals with abnormality	0	0	0	5
Category of abnormality				
Piloerection	0	0	0	4
Hypothermia	0	0	0	2
Pale skin	0	0	0	4
Food was spilled out from container	0	0	0	1

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

* False operation at the time of the dosage. Sacrificed on day 9 of dosing.

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

Table 3. Body weight of males (g), Mean ± S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Days of treatment				
1	400.7 ± 11.2 (13)	401.6 ± 10.3 (13)	402.7 ± 11.7 (13)	402.4 ± 9.6 (13)
7	432.5 ± 16.2 (13)	434.1 ± 12.8 (13)	434.1 ± 16.6 (13)	432.7 ± 13.9 (13)
14	460.9 ± 16.9 (13)	457.8 ± 18.9 (13)	461.5 ± 18.6 (13)	462.2 ± 17.6 (13)
21	483.5 ± 17.6 (13)	478.4 ± 19.6 (13)	481.9 ± 22.5 (13)	484.1 ± 21.1 (13)
28	514.0 ± 19.0 (13)	505.8 ± 24.3 (13)	510.8 ± 29.4 (13)	512.8 ± 22.8 (13)
35	538.8 ± 20.0 (13)	528.0 ± 27.7 (13)	534.2 ± 33.6 (13)	536.3 ± 26.2 (13)
42	548.5 ± 18.7 (13)	540.8 ± 30.7 (13)	546.6 ± 34.6 (13)	546.2 ± 26.3 (13)

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

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 4. Body weight gain of males (g), Mean ± S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Number of males examined	13	13	13	13
Days of treatment				
1-7	31.7 ± 7.5 (13)	32.5 ± 6.2 (13)	31.4 ± 8.3 (13)	30.2 ± 8.5 (13)
7-14	28.5 ± 4.5 (13)	23.7 ± 7.7 (13)	27.4 ± 7.0 (13)	29.5 ± 7.3 (13)
14-21	22.6 ± 9.5 (13)	20.6 ± 5.9 (13)	20.3 ± 6.9 (13)	21.9 ± 8.8 (13)
21-28	30.5 ± 4.6 (13)	27.4 ± 6.2 (13)	28.9 ± 8.4 (13)	28.7 ± 6.9 (13)
28-35	24.8 ± 5.2 (13)	22.2 ± 5.4 (13)	23.4 ± 5.9 (13)	23.4 ± 6.9 (13)
35-42	9.7 ± 6.4 (13)	12.8 ± 7.7 (13)	12.4 ± 5.9 (13)	10.0 ± 7.9 (13)

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

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 5. Cumulative body weight gain of males (g), Mean ± S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Days of treatment				
1-7	31.7 ± 7.5 (13)	32.5 ± 6.2 (13)	31.4 ± 8.3 (13)	30.2 ± 8.5 (13)
1-14	60.2 ± 8.2 (13)	56.3 ± 11.4 (13)	58.8 ± 10.9 (13)	59.8 ± 11.3 (13)
1-21	82.8 ± 12.6 (13)	76.8 ± 13.0 (13)	79.2 ± 16.4 (13)	81.7 ± 15.6 (13)
1-28	113.3 ± 13.5 (13)	104.3 ± 18.1 (13)	108.1 ± 23.5 (13)	110.4 ± 16.7 (13)
1-35	138.1 ± 13.9 (13)	126.4 ± 21.5 (13)	131.5 ± 27.4 (13)	133.8 ± 20.3 (13)
1-42	147.8 ± 13.3 (13)	139.2 ± 22.9 (13)	143.8 ± 28.7 (13)	143.8 ± 21.5 (13)

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

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 6. Body weight of females (g), Mean ± S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Days of treatment				
1	245.4 ± 8.0 (13)	246.9 ± 7.1 (13)	246.4 ± 8.5 (12)	244.5 ± 6.8 (13)
7	251.6 ± 10.3 (13)	257.2 ± 8.8 (13)	259.6 ± 12.3 (12)	254.3 ± 8.1 (13)
14	264.7 ± 13.3 (13)	269.0 ± 11.0 (13)	271.5 ± 16.9 (12)	268.8 ± 9.6 (13)
Days of pregnancy				
0	271.2 ± 13.2 (13)	275.1 ± 11.5 (12)	281.9 ± 17.9 (12)	274.4 ± 11.4 (13)
7	309.4 ± 15.9 (13)	316.9 ± 13.1 (12)	317.6 ± 19.2 (12)	310.4 ± 14.3 (13)
14	348.1 ± 15.7 (13)	357.9 ± 20.9 (12)	355.5 ± 24.1 (12)	344.9 ± 16.8 (13)
21	435.6 ± 20.7 (13)	445.8 ± 25.2 (12)	448.8 ± 32.9 (12)	440.7 ± 29.3 (13)
Days of lactation				
0	304.8 ± 11.1 (13)	312.9 ± 30.0 (12)	309.3 ± 29.7 (12)	304.5 ± 22.7 (11)
4	336.1 ± 20.6 (13)	346.7 ± 30.7 (12)	347.1 ± 28.0 (12)	339.4 ± 15.5 (10)

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

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 7. Body weight gain of females (g), Mean ± S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Days of treatment				
1-7	6.1 ± 9.1 (13)	10.4 ± 4.9 (13)	13.2 ± 7.1 (12)	9.8 ± 6.0 (13)
7-14	13.1 ± 6.2 (13)	11.8 ± 6.2 (13)	11.9 ± 7.8 (12)	14.5 ± 3.3 (13)
Days of pregnancy				
0-7	38.1 ± 7.5 (13)	41.8 ± 7.9 (12)	35.7 ± 7.8 (12)	36.0 ± 6.4 (13)
7-14	38.7 ± 7.9 (13)	41.0 ± 10.6 (12)	37.8 ± 8.0 (12)	34.5 ± 5.2 (13)
14-21	87.5 ± 7.6 (13)	87.9 ± 15.0 (12)	93.4 ± 12.3 (12)	95.8 ± 17.1 (13)
Days of lactation				
0-4	31.3 ± 23.9 (13)	33.8 ± 21.7 (12)	37.8 ± 15.4 (12)	34.0 ± 22.3 (10)

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

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 8. Cumulative body weight gain of females (g), Mean ± S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Days of treatment				
1-7	6.1 ± 9.1 (13)	10.4 ± 4.9 (13)	13.2 ± 7.1 (12)	9.8 ± 6.0 (13)
1-14	19.3 ± 12.5 (13)	22.2 ± 8.1 (13)	25.1 ± 10.7 (12)	24.3 ± 7.6 (13)
Days of pregnancy				
0-7	38.1 ± 7.5 (13)	41.8 ± 7.9 (12)	35.7 ± 7.8 (12)	36.0 ± 6.4 (13)
0-14	76.9 ± 9.1 (13)	82.8 ± 16.3 (12)	73.5 ± 11.6 (12)	70.5 ± 8.5 (13)
0-21	164.3 ± 14.7 (13)	170.7 ± 22.3 (12)	166.9 ± 20.5 (12)	166.3 ± 22.9 (13)
Days of lactation				
0-4	31.3 ± 23.9 (13)	33.8 ± 21.7 (12)	37.8 ± 15.4 (12)	34.0 ± 22.3 (10)

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

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 9. Food consumption of males (g), Mean ± S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Days of treatment				
1-2	32.3 ± 2.9 (13)	33.3 ± 2.6 (13)	32.4 ± 2.6 (13)	32.0 ± 2.1 (13)
7-8	29.0 ± 3.6 (13)	30.2 ± 3.1 (13)	29.1 ± 3.1 (13)	29.0 ± 2.7 (13)
13-14	30.1 ± 2.6 (13)	30.0 ± 3.5 (13)	31.3 ± 2.9 (13)	30.3 ± 3.0 (13)
29-30	31.1 ± 1.9 (13)	30.7 ± 3.1 (13)	31.7 ± 3.4 (13)	31.5 ± 2.7 (13)
35-36	32.0 ± 2.5 (13)	32.6 ± 2.7 (13)	32.3 ± 3.2 (13)	31.5 ± 2.8 (13)
41-42	29.3 ± 3.2 (13)	29.8 ± 3.0 (13)	30.6 ± 2.3 (13)	29.8 ± 2.8 (13)

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)
[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 10. Food consumption of females (g), Mean ± S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Days of treatment				
1-2	20.2 ± 2.7 (13)	20.3 ± 3.4 (13)	21.2 ± 3.7 (12)	21.1 ± 2.2 (13)
7-8	20.3 ± 2.5 (13)	20.0 ± 1.6 (13)	20.9 ± 2.5 (12)	20.2 ± 2.5 (13)
13-14	21.2 ± 3.0 (13)	20.5 ± 2.9 (13)	22.2 ± 2.9 (12)	22.1 ± 2.7 (13)
Days of pregnancy				
0-1	19.9 ± 3.2 (13)	22.1 ± 2.7 (12)	22.3 ± 3.5 (12)	22.7 ± 2.0 (13)
7-8	28.1 ± 2.6 (13)	28.8 ± 4.3 (12)	28.3 ± 2.6 (12)	27.3 ± 2.7 (12)
14-15	27.9 ± 2.6 (13)	29.1 ± 3.8 (12)	27.9 ± 3.0 (12)	28.0 ± 2.8 (12)
20-21	20.7 ± 3.9 (13)	20.5 ± 6.0 (12)	22.0 ± 5.1 (12)	25.0 ± 5.0 (13)
Days of lactation				
3-4	45.5 ± 8.0 (13)	47.1 ± 9.8 (12)	51.9 ± 5.4 (12)	48.3 ± 10.1 (10)

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)
[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 11. Organ weight of males, Mean ± S.D.

Dose (mg/kg)	0[a]	8	50	300
Number of males examined	13	13	13	13
Terminal body weight (g)	549.8 ± 18.0	541.8 ± 31.0	547.5 ± 35.3	547.6 ± 27.0
Testes (g)	3.59 ± 0.22 [b]	3.57 ± 0.29	3.43 ± 0.22	3.35 ± 0.27
	0.65 ± 0.06 [c]	0.66 ± 0.06	0.63 ± 0.05	0.61 ± 0.06
Epididymides (g)	1.28 ± 0.08	1.25 ± 0.05	1.26 ± 0.11	1.26 ± 0.09
	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.02

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

[a] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

[b] absolute weight

[c] relative weight (g or mg per 100g body weight)

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

Table 12. Organ weight of females, Mean ± S.D.

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Number of dams examined	13	12	12	10
Terminal body weight (g)	342.9 ± 16.4	353.2 ± 29.0	349.0 ± 26.3	344.0 ± 14.2
Ovaries (mg)	104.0 ± 17.9 [b)]	109.6 ± 13.3	110.1 ± 19.2	104.9 ± 11.9
	30.4 ± 6.0 [c)]	31.2 ± 4.2	31.5 ± 4.8	30.5 ± 3.4

Values represent mean±S.D.
Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)
[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)
[b)] absolute weight
[c)] relative weight (g or mg per 100g body weight)

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

Table 13. Macroscopic findings in males

Dose (mg/kg)	0[a)]		8		50		300	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Epididymis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Nodule, white, cauda, left side	12	1	13	0	13	0	13	0

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

-, Negative; +, Positive

[ ], Number of animals examined

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 14. Macroscopic findings in females (Subjected to autopsy on day 5 of lactation)

Dose (mg/kg)	0[a)]		8		50		300	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Vagina)	[13]		[12]		[12]		[10]	
Nodule, yellowish white, serosa	13	0	13	0	12	1	10	0

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

-, Negative; +, Positive

[ ], Number of animals examined

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 15. Histopathological findings in males

Dose (mg/kg)	0[a]						8						50						300					
Grade	-	±	+	2+	3+	Pos.	-	±	+	2+	3+	Pos.	-	±	+	2+	3+	Pos.	-	±	+	2+	3+	Pos.
(Testis)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Atrophy, seminiferous tubule, bilateral	12	1	0	0	0	1													13	0	0	0	0	0
Atrophy, seminiferous tubule, unilateral	11	2	0	0	0	2													10	3	0	0	0	3
(Epididymis)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Cell debris, lumen, bilateral	12	1	0	0	0	1													13	0	0	0	0	0
Cell debris, lumen, unilateral	12	1	0	0	0	1													12	1	0	0	0	1
Spermatic granuloma, unilateral, cauda	12	1	0	0	0	1													13	0	0	0	0	0

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)
-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; 2+, Moderate; 3+, Marked; Pos., Total of positive grade
[ ], Number of animals examined
[a] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 16. Histopathological findings in females (Subjected to autopsy on day 5 of lactation)

Dose (mg/kg)	0[a]							8							50							300						
Grade	-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.
(Ovary)	[13]							[0]							[0]							[10]						
Abnormality	13	0	0	0	0		0															10	0	0	0	0		0
(Urinary bladder)	[0]							[0]							[1]							[0]						
Diverticulum															0					1	1							

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

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; 2+, Moderate; 3+, Marked; P, Non-graded change; Pos., Total of positive grade

[ ], Number of animals examined

[a] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 17. Results of observations about estrus cycle

Dose (mg/kg)	0[a]	8	50	300
Number of animals examined	13	13	12	13
Pre-treatment period				
Number of animals showing type of cycle				
4-day cycle	12	11	9	12
4 and 5-day cycle	0	0	0	0
5-day cycle	1	2	3	1
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D. (N)	4.1 ± 0.3 (13)	4.2 ± 0.4 (13)	4.3 ± 0.5 (12)	4.1 ± 0.3 (13)
Treatment period				
Number of animals showing each type of cycle				
4-day cycle	12	11	9	9
4 and 5-day cycle	0	1	0	1
5-day cycle	0	1	3	2
irregular	1	0	0	1
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D. (N)	4.0 ± 0.0 (12)	4.1 ± 0.3 (13)	4.3 ± 0.5 (12)	4.2 ± 0.4 (12)
Frequency of animals of which type of estrus cycle was changed after the treatment	1 / 13	1 / 13	0 / 12	3 / 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 (12)	1.0 ± 0.0 (13)

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)
[a] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 18. Results of observations about reproductive performance

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Number of mated pairs [A]	13	13	12	13
Number of copulated pairs [B]	13	13	12	13
Copulation index [(B/A)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile males [C]	13	12	12	13
Fertility index [(C/B)×100,%]	100.0	92.3	100.0	100.0
Pairing days until copulation				
; Mean±S.D.	2.4 ± 1.3	2.7 ± 1.3	2.8 ± 1.5	2.7 ± 1.3

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

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 19. Development of F_1 pups up to day 4 of lactation, Mean±S.D.

Dose (mg/kg)	0[a)]	8	50	300
Number of pregnant females	13	13	12	13
Number of pregnant females with live pups	13	12	12	11 [b)]
Delivery index (dams, %)	100.0	92.3	100.0	84.6
Gestation length ; days	22.4 ± 0.5 (13)	22.8 ± 0.5 (12)	23.0 ± 0.0 ** (12)	23.0 ± 0.4 ** (11)
Number of corpora lutea	17.8 ± 2.2 (13)	18.4 ± 3.3 (12)	17.3 ± 1.3 (12)	16.9 ± 1.3 (11)
Number of implantations	15.9 ± 1.5 (13)	16.3 ± 2.7 (12)	16.2 ± 1.0 (12)	15.8 ± 1.9 (11)
Implantations index	90.7 ± 11.9 (13)	89.6 ± 16.3 (12)	94.0 ± 5.7 (12)	93.5 ± 8.1 (11)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	14.8 ± 2.1 (13)	14.8 ± 3.1 (12)	14.3 ± 1.5 (12)	13.7 ± 3.1 (11)
Delivery index (pups)	92.5 ± 7.5 (13)	90.7 ± 8.2 (12)	88.3 ± 8.7 (12)	86.7 ± 16.1 (11)
Number of live pups				
Males	6.4 ± 2.5 (13)	5.8 ± 2.1 (12)	6.6 ± 2.1 (12)	6.3 ± 2.6 (11)
Females	8.3 ± 3.4 (13)	8.7 ± 2.2 (12)	7.3 ± 2.2 (12)	6.5 ± 2.7 (11)
Total	14.7 ± 2.1 (13)	14.4 ± 2.7 (12)	13.8 ± 1.5 (12)	12.8 ± 4.1 (11)
Sex ratio on day 0	44.3 ± 18.3 (13)	39.4 ± 12.1 (12)	47.6 ± 14.1 (12)	48.1 ± 13.2 (11)
Birth index	92.1 ± 7.9 (13)	88.4 ± 7.1 (12)	85.8 ± 10.1 (12)	81.2 ± 24.7 (11)
Live birth index	99.5 ± 1.7 (13)	97.7 ± 5.4 (12)	97.2 ± 5.3 (12)	92.0 ± 20.7 (11)
Day 4 of lactation				
Number of live pups				
Males	6.4 ± 2.5 (13)	5.6 ± 2.2 (12)	6.6 ± 2.1 (12)	5.9 ± 3.0 (11)
Females	8.2 ± 3.2 (13)	8.3 ± 2.1 (12)	7.2 ± 2.2 (12)	6.3 ± 3.1 (11)
Total	14.5 ± 1.9 (13)	13.9 ± 2.6 (12)	13.8 ± 1.4 (12)	12.2 ± 5.0 (11)
Sex ratio on day 4	44.7 ± 18.2 (13)	39.4 ± 12.2 (12)	47.9 ± 14.3 (12)	48.0 ± 14.6 (10)
Viability index				
Males	100.0 ± 0.0 (13)	97.2 ± 9.6 (12)	100.0 ± 0.0 (12)	85.1 ± 32.0 (11)
Females	98.6 ± 3.6 (13)	96.9 ± 8.1 (12)	98.8 ± 4.1 (12)	89.4 ± 30.1 (11)
Total	99.1 ± 2.2 (13)	97.0 ± 8.5 (12)	99.5 ± 1.8 (12)	87.5 ± 30.0 (11)

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)
Parenthesis indicates number of dams.
[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)
[b)] All pups of one dam were died on day 1 of lactation.
Delivery index (dams) = (number of pregnant females with live pups / number of pregnant females) × 100, %
Delivery index (pups) = (number of pups born / number of implantations) × 100, %
Birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantatios) × 100, %
Live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born) × 100, %
Sex ratio = (number of male live pups / number of live pups) × 100, %
Viability index on day 4 of lactation = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 0) × 100, %

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

Table 20. Body weight of F_1 pups , Mean ± S.D. (N)

Dose (mg/kg)		0[a)]	8	50	300
Day 0					
No. of pups (male/female)		83 / 108	69 / 104	79 / 87	69 / 72
Male		6.4 ± 2.5 (13)	5.8 ± 2.1 (12)	6.6 ± 2.1 (12)	6.3 ± 2.6 (11)
Female		8.3 ± 3.4 (13)	8.7 ± 2.2 (12)	7.3 ± 2.2 (12)	6.5 ± 2.7 (11)
Litter weight(g);	Male	42.5 ± 15.7	39.0 ± 13.8	47.1 ± 15.3	44.4 ± 19.8
	Female	53.2 ± 21.5	55.3 ± 13.4	48.6 ± 13.7	43.6 ± 18.8
Body weight (g);	Male	6.8 ± 0.6	6.9 ± 0.9	7.2 ± 0.7	7.0 ± 0.4
	Female	6.4 ± 0.6	6.5 ± 0.8	6.8 ± 0.6	6.6 ± 0.5
Day 4					
No. of pups (male/female)		83 / 106	67 / 100	79 / 86	65 / 69
Male		6.4 ± 2.5 (13)	5.6 ± 2.2 (12)	6.6 ± 2.1 (12)	6.5 ± 2.5 (10)
Female		8.2 ± 3.2 (13)	8.3 ± 2.1 (12)	7.2 ± 2.2 (12)	6.9 ± 2.5 (10)
Litter weight(g);	Male	65.7 ± 25.6	57.8 ± 20.9	72.5 ± 23.8	73.2 ± 27.7
	Female	81.2 ± 32.0	84.5 ± 23.4	76.6 ± 23.1	74.4 ± 23.7
Body weight (g);	Male	10.4 ± 1.6	10.8 ± 2.0	11.1 ± 1.5	11.5 ± 1.2
	Female	10.0 ± 1.4	10.3 ± 1.9	10.8 ± 1.4	11.0 ± 1.1

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

[a)] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

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

Table 21. Morphological findings of F_1 pups

Dose (mg/kg)	0[a]	8	50	300
Dead pups				
Number of dead pups [b]	3	11	6	17
Number of missing pups	2	5	0	4
Number of dead pups examined	1	6 (4)[c]	6 (4)	13 (10)
Number of dead pups with external changes	0	0	0	0
Number of dead pups with visceral changes	0	0	0	0
Live pups				
Number of live pups examined (postnatal day 0)	191	173	166	141
Number of live pups with external changes	1	0	0	1
Types and number				
bite wound, findlimb	1	0	0	0
bite wound, forelimb	0	0	0	1
Number of live pups examined (postnatal day 4)	189	167	165	134
Number of live pups with external changes	1	0	0	0
Types and number				
bite wound, findlimb	1	0	0	0
Number of live pups with visceral changes	0	0	0	0

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

[a] vehicle control, 0.5%CMC Na (5 mL/kg)

[b] including missing pups

[c] parenthesis indicates number of dead pups with rotten internal organ