

食薬セ研第10-1639号

2000年 9月12日

2-メチル-2-プロペンアミドの
ラットを用いる
経口投与簡易生殖毒性試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦 野 研 究 所

【目 次】

要約	1
緒言	2
方法	3
1. 被験物質	3
2. 使用動物および飼育方法	3
3. 投与検体の調製	4
4. 投与量の設定および投与方法	4
5. 観察および検査	5
6. データ解析法	7
結果	8
1. 親動物	8
2. 生殖能力	10
3. 出生児	11
考察	12
文献	14

Figs. 1～ 4

Tables 1～23

【要 約】

Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS, SPF] 雌雄ラットの交配前 2 週間および交配期間ならびに雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間を通して哺育 3 日まで、2-メチル-2-プロペンアミドの 0、12.5、50 および 200 mg/kg を経口投与し、雌雄ラットに対する生殖毒性について検討した。

成績は、以下のように要約される。

1. 親動物所見

200 mg/kg 投与群の雄13例中 1 例、雌13例中 4 例が死亡し、雌 1 例は切迫屠殺した。一般状態の観察では、200 mg/kg 投与群の全例に歩行異常が観察された。体重は 50 mg/kg 以上の投与群において増加抑制がみられ、摂餌量は雄では 50 mg/kg 以上、雌では 200 mg/kg 投与群において低下した。剖検・病理組織学検査では、200 mg/kg 投与群の肺に炎症像が観察されたが、内部生殖器には 2-メチル-2-プロペンアミドの投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

2. 生殖能力所見

200 mg/kg 投与群の交尾率が低下したが、性周期および受胎率には 2-メチル-2-プロペンアミド投与の影響はみられなかった。200 mg/kg 投与群ではさらに妊娠期間が延長し、分娩および哺育状態に異常が観察された。

3. 出生児所見

200 mg/kg 投与群において出生児の生存率が低下し、体重は低値を示したが、出生児の形態に異常は認められなかった。

4. 無作用量

以上の成績から、本試験条件下における2-メチル-2-プロペンアミドの親動物に対する無作用量は 12.5 mg/kg、生殖能力に対する無作用量は 50 mg/kg、出生児に対する無作用量は 50 mg/kg と判断される。

【緒 言】

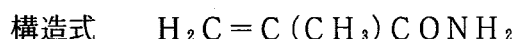
2-メチル-2-プロペンアミド（以下 MPA と略記）は、アクリルアミドの誘導体であり、アクリルアミドに類似した性質を持つと考えられている。ラットを用いる単回経口投与毒性試験でのLD₅₀値は、雄 1789 mg/kg、雌 1774 mg/kg であることが報告されている¹⁾。アクリルアミドはヒトや実験動物に神経症状を誘発するが²⁾、MPA についても神経毒性を示すことが報告されている³⁾。一方、アクリルアミドは精巣萎縮などの生殖毒性も誘発するが³⁾、MPA についての生殖毒性に関する報告は少ない⁴⁾。今回、OECD既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査研究事業の一環として、ラットを用いて MPA の経口投与による簡易生殖毒性試験を行い、本化合物の雌雄動物に及ぼす生殖毒性について検討したので、その結果を報告する。

なお、本試験は、OECD化学物質試験法ガイドライン421／生殖・発生毒性スクリーニング試験（簡易生殖毒性試験）」（1995年7月27日）および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として、2-メチル-2-プロペンアミド（以下 MPA と略記）を用いた。本被験物質は、英名は 2-methyl-2-propenamide であり、CAS No. 79-39-0、分子量：85.11、分子式： C_4H_7NO 、融点 112 - 114℃、沸点 215℃の白色結晶の固体である。MPA の構造式を以下に示す。



試験には、より提供された MPA（ロット番号：純度：99 wt%）を用いた。受領した被験物質は、使用時まで被験物質受領保管室において、室温で保管した。

2. 使用動物および飼育方法

7 週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS、SPF] 雌雄ラットを日本チャールス・リバー株式会社筑波飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて入荷後12日間予備飼育した。予備飼育中、雌 1 例（入荷時 No. 59）は尿潜血陽性を示したため、試験から除外した。その他の動物に一般状態の異常は認められなかった。なお、雌は予備飼育中に毎日膣スメアを採取し、性周期が 4 日周期を示した動物のみを試験に供した。動物は、検疫終了日の体重を基に体重別層化無作為抽出法により群分けし、雌雄とも 1 群13匹からなる 4 群に分けた。これらの雌雄には、油性フェルトペンにより尾に個体識別番号を示す番号を印字し、各飼育ケージには、投与群ごとに色彩の異なる動物カードに試験計画番号および個体識別番号を記入して掛けた。出生児に関しては個体識別は行わなかった。投与開始時の週齢は、雌雄ともに 9 週齢であった（注）。

（注） 動物入荷日：1999年 1 月13日
入荷匹数：雄57匹、雌73匹
入荷時体重：雄 217.0～244.0g、雌 174.9～192.7g
投与開始日：1999年 1 月26日
投与開始時体重：雄 346.9～399.3g、雌 217.9～266.0g

動物は、基準温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、基準湿度50～65%、換気回数約15回/時、照明12時間（7時～19時点灯）に制御された飼育室で、金属製ケージ（220w×270d×190h mm）に1匹ずつ（交配時は2匹）収容し、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。ただし、交尾が確認された雌については、妊娠14日から哺育4日まで、紙パルプ製チップ（ALPHA-dri 加商株式会社）を入れたプラスチック製ラット用繁殖ケージ（350w×400d×180h mm）に収容した。なお、飼育期間中、Appendix A に示す飼育環境の異常があったが、試験に支障をきたす異常ではなかった。また、供給した飼料、水道水および紙パルプ製チップには、試験に支障をきたす可能性のある混入物はなかった。

3. 投与検体の調製

投与検体は、MPA を各濃度ごとに秤量し、注射用水（製造番号：9707SA、光製薬株式会社）に溶解して調製した。調製した検体は投与時まで冷蔵、遮光条件下で保存し、調製後1週間以内に使用した。

本試験に先立ち、秦野研究所で実施した調製検体の安定性試験において、被験物質の0.25 および4% (w/v) の調製検体の、冷蔵、遮光条件下での12日間の安定性を確認した（Appendix B）。また、初回調製時の各濃度の投与検体について、被験物質の含量測定を実施した結果、いずれも所定濃度の規定範囲内にあることを確認した（Appendix C）。なお、本投与検体は溶液であることから、均一性試験は実施しなかった。調製検体中の被験物質の濃度は、ガスクロマトグラフ法により測定した（Appendix D）。

4. 投与量の設定および投与方法

投与経路は、OECD化学物質試験法ガイドラインによりラット用胃管による強制経口投与とした。投与量は、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：R-98-016）の結果をもとに設定した。すなわち、雌雄ラットにMPAの0、50、100 および200 mg/kg を14日間反復経口投与した結果、100 mg/kg 以上の投与群で体重増加の抑制および摂餌量の低下傾向がみられ、200 mg/kg 投与群では、精巣および精巣上体の重量が増加する傾向が認められたが、200 mg/kg は最大耐量を下回る量と判断されたことから、高用量には200 mg/kg を設定し、公比4で減じて中用量には50 mg/kg を、低用量には12.5 mg/kg を設定した。対照群には、MPAの媒体である注射用水を用いた。

投与期間は、雄に対しては交配前2週間、交配期間（最長2週間）、剖検前日まで（総投与回数42回）、雌に対しては交配前2週間、交配期間（最長2週間）および妊娠期間を通して哺育3日（分娩日＝哺育0日）までとし、1日1回、9時から13時の間に投与した。

投与容量は体重1kg当たり5mLとし、雄および交配前、交配期間中の雌では、週1回測定した体重を基に、交尾後の雌では、最新の測定日の体重を基に算出した。

各群の投与量、投与容量、調製濃度および動物番号は次の通りである。

群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (w/v%)	動物番号	
					雄	雌
1	注射用水	0	5	0	MX01001～13	FB01001～13
2	MPA	12.5	5	0.25	MX02001～13	FB02001～13
3	MPA	50	5	1	MX03001～13	FB03001～13
4	MPA	200	5	4	MX04001～13	FB04001～13

5. 観察および検査

1) 親動物

(1) 一般状態

飼育期間中、毎日1回以上観察した。死亡例については発見後直ちに剖検した。また、翌日まで生存の可能性がないと判断された瀕死動物については、剖検の項に記載した検査を行った。

(2) 体重測定

投与期間中週1回〔雄：投与1、8、15、22、29、36、43日、雌：投与1、8、15日（未交尾雌は投与22、29、36、43、50日）〕および解剖日に測定した。交尾が確認された雌では妊娠0、7、14、20日に、分娩した雌では哺育0および4日に測定した。

(3) 摂餌量測定

投与期間中（交配期間を除く）週1回、体重測定日と同じ日に餌重量を測定し、1週間の摂餌量を算出した。交尾が確認された雌では妊娠0～7、7～14、14～20日および分娩した雌では、哺育0～4日の摂餌量を測定した。

(4) 交配

投与開始日より、交尾確認日まで膣スミア標本を作製した。交配は、投与15日の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で連続同居方式で行った。交尾の確認は、膣スミア中の精子の存在および膣栓の確認により行い、交尾が確認された雌については、その日を妊娠0日として起算するとともに、雄から分離して個別に飼育した。交配結果および妊娠の成否により、各投与群における交尾率〔(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〕、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を求めた。

(5) 分娩・哺育状態の観察

交尾が確認された雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の直接観察は観察可能な動物について行い、分娩状態が直接観察できなかった動物についても、分娩後の徴候から分娩障害の有無を判断して記録した。分娩の確認は、午前9時～11時に行い、分娩が完了していることを確認した動物については、その日を分娩日（哺育0日）として妊娠期間（妊娠0日～分娩日の日数）を計算した。分娩後は哺育状態を毎日観察した。

(6) 剖検・病理組織学検査

雄動物は、投与42日の翌日に、致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、剖検した。その際、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、精巣および精巣上体はブアン液に固定し、高用量群および対照群の全例について、病理組織学検査を実施した。剖検により異常を認めた器官は、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。

雌動物のうち、分娩した雌は哺育4日に、交尾は確認されたが分娩しなかった雌は妊娠26日相当日に、また交尾が確認されなかった雌は交配期間終了24日後に、それぞれ致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、剖検した。その際、卵巣および子宮を摘出して、卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数え、子宮については着床数を数え、着床率〔(着床数/黄体数)×100〕を算出した。卵巣については、さらにブアン液に固定し、高用量群および対照群の全例について、病理組織学検査を実施した。剖検により異常を認めた器官は、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

(1) 産児数および死亡児

哺育0日に産児数（生存児＋死亡児）を調べて、分娩率〔（産児数／着床痕数）×100〕および生児出産率〔（出產生児数／着床痕数）×100〕を求めた。また、出産率〔（生児出産雌数／妊娠動物数）×100〕を算出した。生存児は外表を観察し、性別および外表奇形（矮小児を含む）の有無を検査した。

哺育0日以降は死亡児数を毎日調べ、出生率〔（出產生児数／総産児数）×100〕および新生児生存率〔（哺育4日の生児数／哺育0日の生児数）×100〕を求めた。死亡児は剖検し、外表および内部器官の異常の有無を観察した。

(2) 体重

哺育0および4日に個体別に測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出した。

(3) 剖検

出生児は哺育4日に剖検し、外表および内部器官の異常の有無を観察した。

6. データ解析法

交尾率、受胎率および出生児の形態異常出現頻度については Fisher の直接確率検定⁵⁾を行った。病理組織学所見では、グレード分けしたデータは、Mann-WhitneyのU検定^{5, 6)}により、陽性グレードの合計値は Fisher の直確率の片側検定により対照群と MPA 投与群の間の有意差検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは各腹ごとの平均値を1標本として、先ず Bartlett 法⁷⁾により各群の分散の一樣性について検定を行った。分散が一樣である場合には、一元配置型の分散分析⁷⁾を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett 法⁸⁾により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が0となる場合および分散が一樣でない場合には、Kruskal-Wallis の順位検定⁹⁾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。

【結 果】

1. 親動物

1) 死亡動物 (Tables 1、2 ; Appendices 1-1~2-4)

200 mg/kg 投与群の雄 1 例および雌 4 例が投与27日以降に途中死亡したほか、同群の雌 1 例を切迫屠殺した。50 mg/kg 以下の投与群においては、死亡動物はいなかった。

2) 一般状態 (Tables 1、2 ; Appendices 1-1~2-4)

歩行異常（引きずり歩行）が 200 mg/kg 投与群の雌雄全例に観察された。歩行異常は最も早い動物で投与23日から観察され、いずれの動物においても剖検日または死亡前日まで継続して認められた。同群ではさらに消瘦が雄 2 例、雌 1 例、自発運動減少が雌 1 例、一過性の流涎が雄 1 例、排便量減少が雌雄各 1 例、努力呼吸が雌 1 例、体表温低下が雌 2 例、紅涙が雌 1 例、頻呼吸および立毛が雌 1 例、口または排泄口周囲の汚れが雄 1 例、雌 4 例に観察された。その他の投与群では、前肢の脱毛が対照群の雌雄各 1 例、12.5 mg/kg 投与群の雌 1 例に、紅涙が対照群の雄 1 例および 12.5 mg/kg 投与群の雄 1 例に観察された。

3) 体重

(1) 雄 (Fig. 1 ; Tables 3、4 ; Appendices 3-1~4-4)

50 mg/kg 以上の投与群において体重の増加抑制がみられた。50 mg/kg 投与群では投与初期に体重増加量が対照群と比較して有意に低下し、200 mg/kg 投与群では全投与期間を通して、体重が対照群よりも低値で推移した。

(2) 雌 (Fig. 2 ; Tables 5~10 ; Appendices 5-1~10-4)

50 mg/kg 以上の投与群において体重の増加抑制がみられた。50 mg/kg 投与群では投与 1 ~ 8 日の体重増加量が対照群と比較して有意に低下し、200 mg/kg 投与群では妊娠および分娩後を含む全投与期間を通して、体重が対照群よりも低値で推移した。その他 12.5 および 50 mg/kg 投与群では、妊娠 0 ~ 14日の体重増加量が対照群と比較して有意に増加した。

4) 摂餌量

(1) 雄 (Fig. 3; Table 11; Appendices 11-1~11-4)

50 mg/kg 以上の投与群において摂餌量の低下が認められた。50 mg/kg 投与群では投与 8~15日の摂餌量が対照群と比較して有意に低下し、200 mg/kg 投与群では全投与期間を通して、摂餌量が対照群よりも低値で推移した。

(2) 雌 (Fig. 4; Tables 12~14; Appendices 12-1~14-4)

200 mg/kg 投与群において摂餌量の低下が認められ、投与 1~8日、妊娠 7~14日および哺育 0~4日の値が対照群より有意に低下した。50 mg/kg 以下の投与群においては、対照群との間に有意差は認められなかった。

5) 剖検所見

(1) 死亡および切迫屠殺例 (Table 15)

子宮の浸軟胎児が雌 1例に観察された。肺には淡色部が雌 2例、暗色部が雄 1例、雌 4例に観察されたほか、腎盂の拡張および膀胱の拡張が雌 1例に認められた。

(2) 投与終了時剖検例 (Table 16; Appendices 16-1、16-2)

子宮の浸軟胎児が対照群の 1例に認められ、精巣上体には淡色結節が対照群の 2例および 200 mg/kg 投与群の 1例に、暗色結節が 12.5 mg/kg 投与群の 1例に観察された。さらに、200 mg/kg 投与群の肺には、淡色部が雌雄各 2例、暗色部が雄 6例、雌 3例、暗色点が雄 1例に観察された。

6) 器官重量 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

精巣および精巣上体の実重量には、対照群と MPA 各投与群との間に有意差は認められなかった。精巣および精巣上体の比体重値は、200 mg/kg 投与群の値が対照群と比較して有意な高値を示した。

7) 病理組織所見

(1) 死亡および切迫屠殺例 (Table 18)

卵巣、精巣および精巣上体に著変は認められなかった。肺では、異物巨細胞を伴った肉

芽腫が雌 4 例に、水腫および好中球浸潤が雄 1 例、雌 4 例に、マクロファージの浸潤が雄 1 例、雌 3 例に、動脈の鉍質沈着が雌 1 例、出血が雄 1 例に観察され、気管支では腔内に好中球の浸潤および異物が雌 3 例、雄 1 例、腎臓では乳頭に好中球の浸潤および蛋白円柱が雌 1 例、膀胱には粘膜下織の出血が雌 1 例に観察された。

(2) 投与終了時剖検例 (Table 19 ; Appendices 19-1、19-2)

精巣上体には、精子肉芽腫が 200 mg/kg 投与群の 2 例に観察された。精巣および卵巣には著変はみられなかった。さらに病変部として 200 mg/kg 投与群の雄 7 例、雌 3 例の肺および気管支を検索した結果、肺には異物巨細胞を伴った肉芽腫が雌雄各 3 例、肉芽腫が雄 1 例、水腫が雄 1 例および雌 3 例に、好中球浸潤が雌雄全例に、マクロファージの浸潤が雌雄各 3 例、動脈の鉍質沈着が雌雄各 1 例、出血が雄 2 例に認められ、気管支では腔内の好中球浸潤が雄 2 例、雌 1 例に、気管支腔内の異物が雌 1 例に観察された。

2. 生殖能力

1) 性周期および交配成績 (Tables 20、21 ; Appendices 20-1~21-4)

性周期には MPA 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。交配検査の結果、200 mg/kg 投与群で交尾率が低下したが、受胎率には MPA 投与の影響は認められなかった。また、交尾までの日数およびその間の発情数に、対照群と MPA 各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 22 ; Appendices 22-1~22-4)

出産率には MPA 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。妊娠期間は 200 mg/kg 投与群において有意に延長したが、50 mg/kg 以下の投与群では対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 22 ; Appendices 22-1~22-4)

黄体数、着床数および着床率に MPA 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

4) 分娩および哺育状態

分娩状態の観察では、分娩時間の延長が 200 mg/kg 投与群の 2 例に観察され、その

内の1例は哺育2日に母動物が死亡し、他の1例は哺育3日に全児が死亡した。哺育状態の観察では、児にミルクスポットが確認されない例が12.5 mg/kg 投与群の1例および200 mg/kg 投与群の4例に、乳頭突出不良が12.5 mg/kg 投与群の1例および200 mg/kg 投与群の2例に観察された。200 mg/kg 投与群ではさらに、児を集めない例が2例に観察された。

3. 出生児

1) 生存性 (Table 22 ; Appendices 22-1~22-4)

200 mg/kg 投与群の総出産児数が低下傾向を示し、分娩率、出産生児数、出生率、生児出産率、哺育4日の生児数および新生児生存率が対照群と比較して有意に低下した。50 mg/kg 以下の投与群には著変はみられなかった。

2) 体重 (Table 23 ; Appendices 23-1~23-4)

200 mg/kg 投与群の哺育0日の体重が雌雄とも有意に低下し、哺育4日の体重が雌雄とも低下傾向を示した。50 mg/kg 以下の投与群においては、対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 形態

哺育0日の生存児に外表奇形は観察されなかった。なお、矮小児が50 mg/kg 投与群に1例、200 mg/kg 投与群の1腹に6例みられた。哺育4日の剖検では異常は認められなかった。

【考 察】

MPA の 12.5、50 および 200 mg/kg を Sprague-Dawley 系雌雄ラットに交配前 2 週間および交配期間、ならびに雄では交配終了後 2 週間、雌では妊娠期間を通して哺育 3 日まで経口投与し、MPA の生殖毒性について検討した。

その結果、200 mg/kg 投与群において歩行異常が全例に観察され、雄 1 例および雌 4 例が死亡したほか、同群の雌 1 例を切迫屠殺した。MPA はアクリルアミドに類似した末梢性の神経毒性を示す物質として報告³⁾されており、Wistar ラットを用いた実験¹⁰⁾において脛骨および腓骨神経に髄鞘の萎縮や消失が認められている。したがって、本試験でみられた歩行異常は MPA の投与により誘発された変化と判断される。体重および摂餌量は、50 mg/kg 以上の投与群において用量依存的に抑制された。ラットを用いる 28 日間反復投与毒性試験¹¹⁾においても、同様の変化がみられていることから、体重および摂餌量の変化も MPA の投与に起因した変化と考えられる。なお、12.5 および 50 mg/kg 投与群の妊娠 0～14 日の体重増加量が対照群よりもやや高値を示したが、これらは偶発的な変化であり、MPA の影響を示唆するものではないと判断した。剖検および病理組織学検査では、200 mg/kg 投与群の肺に炎症像が観察され、その程度は死亡例で重度であった。アクリルアミドを含む類似物質では、本試験でみられた肺病変の原因を特定できる情報は得られなかったが、本試験の 50 mg/kg 以下の投与群では肺に異常はみられていないこと、200 mg/kg 投与群では気管支腔内に異物がみられていることなどから、高濃度の MPA の投与により神経障害に関連した誤嚥を引き起こした可能性が考えられる。一方、内部生殖器には、死亡例を含む全ての動物で著変は認められなかった。雄の ddY マウスを用いた実験³⁾においても、MPA は他のアクリルアミド類似物質と異なり、精巣には影響を及ぼさないことが報告されていることから、MPA は神経症状を呈する用量を反復投与しても内部生殖器の異常は起こさないものと考えられた。なお、200 mg/kg 投与群の精巣および精巣上体の相対重量が対照群よりも高値を示したが、これらは同群の解剖時体重が低値であったことに起因するもので、MPA の雄性生殖器への影響を示唆する変化ではないと判断した。

生殖能力については、200 mg/kg 投与群で交尾率が低下した。雌の性周期および受胎率には MPA の影響はみられなかったこと、アクリルアミドにおいても神経症状を呈す用量では交尾行動に異常¹²⁾が報告されていることなどから、MPA は歩行異常以外に交尾

行動にも影響を及ぼす可能性が示唆された。その他、200 mg/kg 投与群では群平均の妊娠期間が延長し、分娩および哺育状態に関しても、分娩時間の延長や児を集めないなどの異常を示した例が観察されたことから、MPA 投与の影響が疑われた。なお、妊娠動物の黄体数、着床数および着床率には、MPA 投与の影響はみられなかったことから、アクリルアミドで報告されている着床への影響¹³⁾は、MPA にはないと考えられる。

出生児については、生存性が 200 mg/kg 投与群において低下し、同群の出生児体重も低値を示した。Swiss マウスを用いた発生毒性試験¹⁴⁾では、180 mg/kg/day の投与により出生児の生存性の低下、120 mg/kg/day 以上の投与により出生児体重の低下が報告されていることから、MPA が出生児に影響を及ぼす可能性は否定できない。しかしながら、本試験の 200 mg/kg 投与群においては、母動物の体重推移も対照群と比較すると著しく低下していること、出生児の形態には何ら異常は認められていないことなどから、出生児にみられた変化は、母体環境の悪化に伴った二次的影響と考える方が妥当であろう。

以上の成績から、本試験条件下における MPA の親動物に対する無作用量は 12.5 mg/kg、親動物の生殖能力に対する無作用量は 50 mg/kg、出生児に対する無作用量は 50 mg/kg と判断される。

【文 献】

- 1) 須永昌男ら：メタクリルアミドのラットを用いる単回経口投与毒性試験. 化学物質毒性試験報告 7: 41-43 (1999)
- 2) Tilson, H. A.: The neurotoxicity of acrylamide: An overview.
Neurobehav. Toxicol. Teratol. 3:445-461 (1981)
- 3) Hashimoto, K., Sakamoto, J., Tanii, H.: Neurotoxicity of acrylamide and related compounds and their effects on male gonads in mice.
Arch. Toxicol. 47:179-189 (1981)
- 4) Chapin, R. E., et al.: The reproductive and neural toxicities of acrylamide and three analogues in Swiss mice, evaluated using the continuous breeding protocol. Fundam. Appl. Toxicol. 27:9-24 (1995)
- 5) 石居進：「生物統計学入門」，培風館，東京（1992）
- 6) 丹後俊郎：「医学への統計学」（古川俊之 監修），朝倉書店，東京（1985）
- 7) 佐久間昭：「薬効評価－計画と解析」，東京大学出版会，東京（1977）
- 8) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control.
Biometrics 20 : 482-491 (1964)
- 9) Kruskal, W. H., Wallis, W. A.: Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Assoc. 47 : 583-621 (1952)
- 10) Tanii, H., Hashimoto k.: Neurotoxicity of acrylamide and related compounds in rats: Effects on rotarod performance, morphology of nerves and neurotubulin. Arch. Toxicol. 54:203-213 (1983)
- 11) 須永昌男ら：メタクリルアミドのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験. 化学物質毒性試験報告 7: 41-57 (1999)
- 12) Zenick, H., Hope, E.: Reproductive toxicity associated with acrylamide treatment in male and female rats.
J. Toxicol. Environ. Health 17:457-472 (1986)
- 13) Holland, N., et al.: Acrylamide causes preimplantation abnormalities in embryos and induces chromatin-adducts in male germ cells of mice.
Reprod. Toxicol. 13:167-178 (1999)

- 14) George, J. D., et al.: Developmental toxicity of methacrylamide (MAC) in mice. Toxicologist 11:343 (1991)

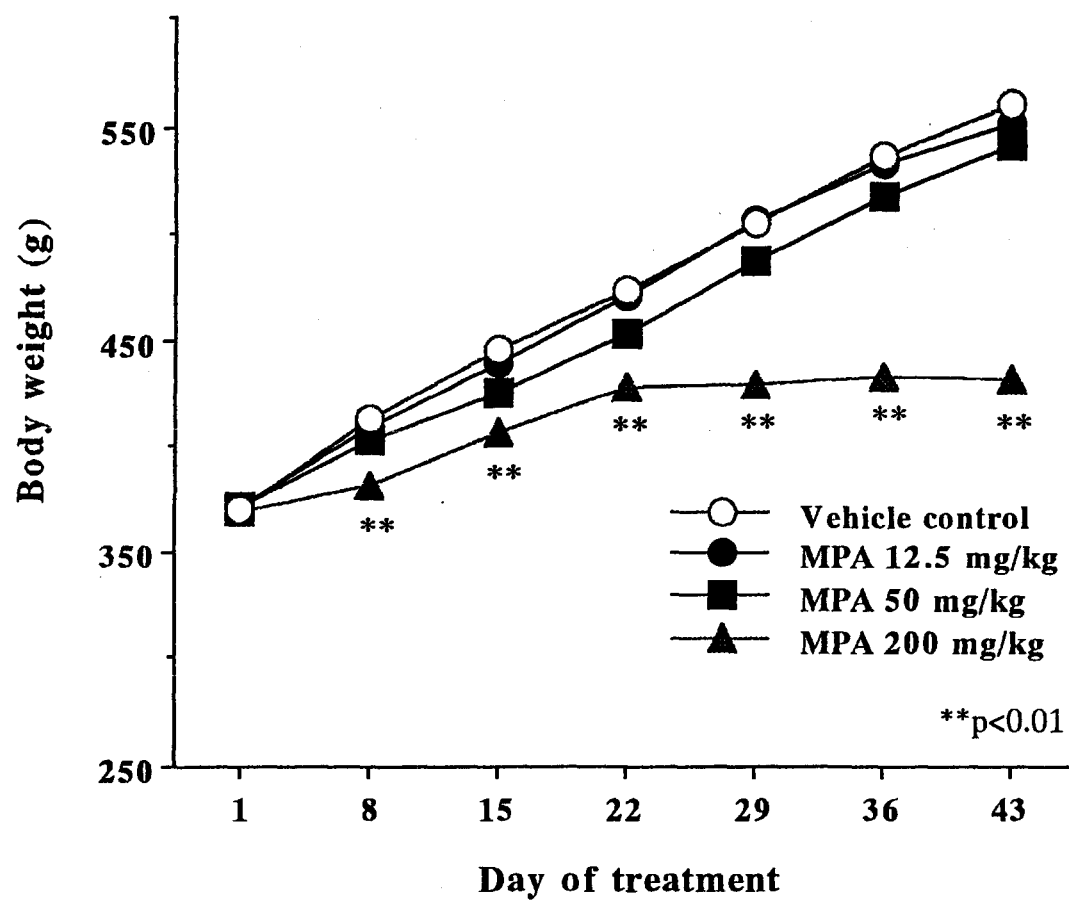


Fig. 1 Mean body weight of Fo males

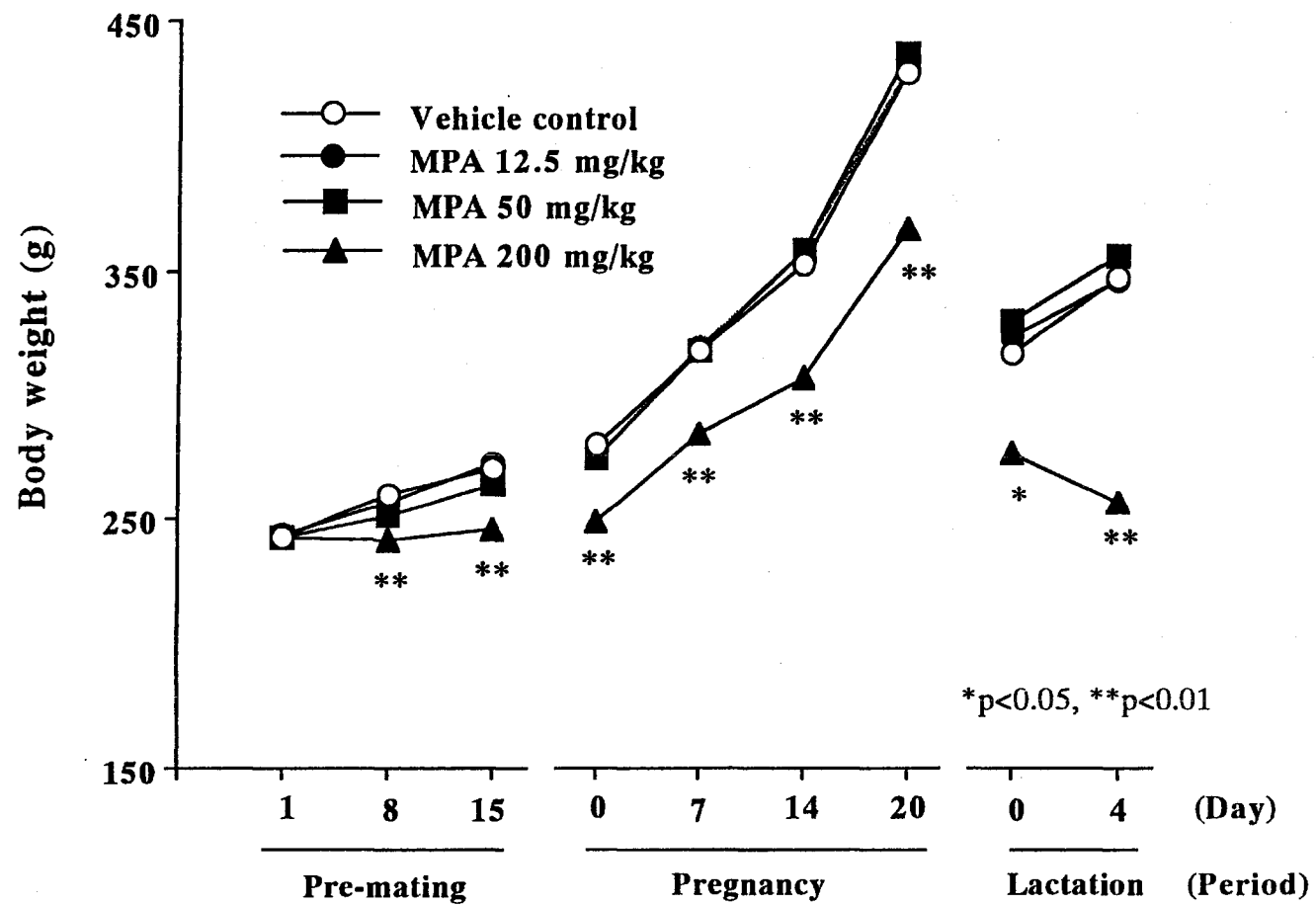


Fig. 2 Mean body weight of Fo females

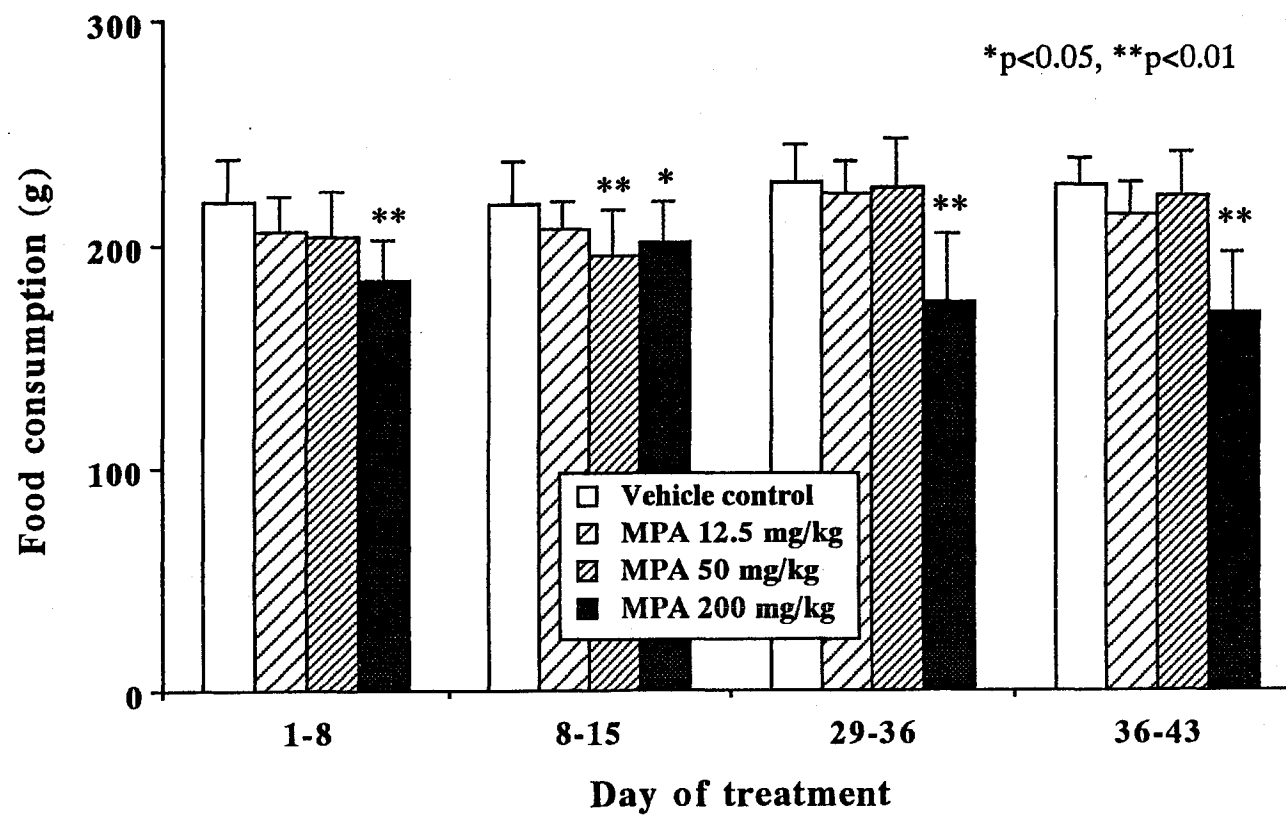


Fig. 3 Mean food consumption of Fo males

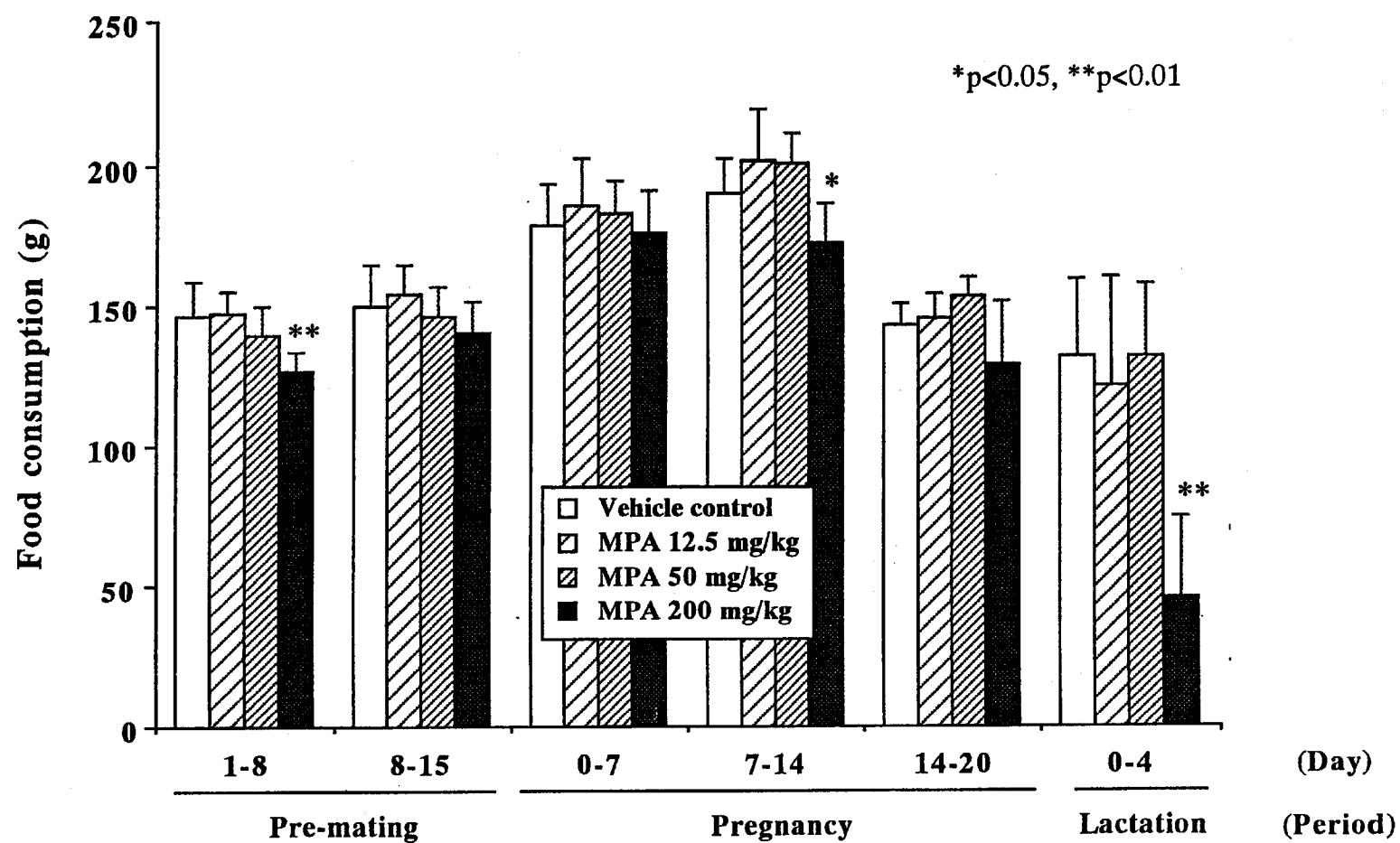


Fig. 4 Mean food consumption of Fo females

【Table Index】

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Table	(Appendix)	Table Title
1	(1-1 ~ 1-4)	Summary of clinical signs of males
2	(2-1 ~ 2-4)	Summary of clinical signs of females
3	(3-1 ~ 3-4)	Body weight of F ₀ males
4	(4-1 ~ 4-4)	Body weight gain of F ₀ males
5	(5-1 ~ 5-5)	Body weight of F ₀ females during pre-mating period
6	(6-1 ~ 6-4)	Body weight gain of F ₀ females during pre-mating period
7	(7-1 ~ 7-4)	Body weight of F ₀ females during pregnancy period
8	(8-1 ~ 8-4)	Body weight gain of F ₀ females during pregnancy period
9	(9-1 ~ 9-4)	Body weight of F ₀ females during lactation period
10	(10-1 ~10-4)	Body weight gain of F ₀ females during lactation period
11	(11-1 ~11-4)	Food consumption of F ₀ males
12	(12-1 ~12-4)	Food consumption of F ₀ females during pre-mating period
13	(13-1 ~13-4)	Food consumption of F ₀ females during pregnancy period
14	(14-1 ~14-4)	Food consumption of F ₀ females during lactation period
15		Macroscopical findings in individual male and females sacrificed or died in dosing period
16	(16-1 ~16-2)	Macroscopical findings in animals at the end of doing period
17	(17-1 ~17-4)	Organ weight of F ₀ males
18		Histological findings in individual male and females sacrificed or died in dosig period
19	(19-1 ~19-2)	Histological findings in animals at the end of doing period
20	(20-1 ~20-4)	Summary of estrous cycles
21	(21-1 ~21-4)	Reproductive performance of animals
22	(22-1 ~22-4)	Development of pups up to day 4 of lactation
23	(23-1 ~23-4)	Body weight of pups up to day 4 of lactation

Table 1

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Summary of clinical signs of males

Compound	MPA			
	0	12.5	50	200
Dose group (mg/kg)				
No. of males examined	13	13	13	13
No. of males with abnormality	2	1	0	13
<u>Category of abnormality; N</u>				
Death	0	0	0	1
Dragging of hindlimbs	0	0	0	13
Wasting	0	0	0	2
Temporary salivation	0	0	0	1
Decrease in feces volume	0	0	0	1
Reddish tear	1	1	0	0
Loss of fur	1	0	0	0
Soiled fur	0	0	0	1

Table 2

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Summary of clinical signs of females

Compound	MPA			
	0	12.5	50	200
Dose group (mg/kg)				
No. of females examined	13	13	13	13
No. of females with abnormality	1	1	0	13
<u>Category of abnormality; N</u>				
Death	0	0	0	4
Sacrificed at moribund	0	0	0	1
Dragging of hindlimbs	0	0	0	13
Wasting	0	0	0	1
Low-spirited	0	0	0	1
Decrease in feces volume	0	0	0	1
Gasping	0	0	0	1
Subnormal temperature	0	0	0	2
Reddish tear	0	0	0	1
Tachypnea	0	0	0	1
Piloerection	0	0	0	1
Loss of fur	1	1	0	0
Soiled fur	0	0	0	4

Table 3

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Body weight of F₀ males (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
Dose (mg/kg)	0	12.5	50	200
Day of treatment				
1	370.4 ± 14.2 (13)	371.3 ± 13.4 (13)	370.9 ± 13.6 (13)	369.4 ± 12.5 (13)
8	412.6 ± 20.3 (13)	408.6 ± 17.8 (13)	402.5 ± 24.2 (13)	381.9 ± 21.7** (13)
15	445.9 ± 24.0 (13)	440.0 ± 22.2 (13)	425.8 ± 29.6 (13)	407.3 ± 28.4** (13)
22	473.3 ± 26.9 (13)	470.9 ± 25.1 (13)	453.5 ± 32.9 (13)	428.5 ± 33.9** (13)
29	505.4 ± 29.6 (13)	506.3 ± 26.7 (13)	487.4 ± 37.6 (13)	429.3 ± 43.4** (12)
36	537.0 ± 32.3 (13)	533.2 ± 30.7 (13)	517.9 ± 42.8 (13)	433.5 ± 45.6** (12)
43	560.7 ± 33.1 (13)	551.6 ± 34.9 (13)	541.7 ± 46.1 (13)	432.4 ± 50.0** (12)

**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 4

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Body weight gain of F₁ males (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
Dose (mg/kg)	0	12.5	50	200
Day of treatment				
1- 8	42.1 ± 9.4 (13)	37.4 ± 10.6 (13)	31.6 ± 13.5 (13)	12.5 ± 12.8** (13)
8-15	33.3 ± 8.7 (13)	31.3 ± 7.7 (13)	23.3 ± 7.9* (13)	25.4 ± 9.0 (13)
15-22	27.4 ± 4.9 (13)	31.0 ± 9.9 (13)	27.7 ± 6.2 (13)	21.2 ± 13.4 (13)
22-29	32.1 ± 7.5 (13)	35.3 ± 5.1 (13)	33.9 ± 8.2 (13)	4.0 ± 15.6** (12)
29-36	31.6 ± 6.4 (13)	26.9 ± 6.8 (13)	30.5 ± 8.1 (13)	4.2 ± 12.3** (12)
36-43	23.6 ± 6.7 (13)	18.4 ± 8.1 (13)	23.8 ± 7.2 (13)	-1.1 ± 9.8** (12)
.....				
1-15	75.4 ± 15.1 (13)	68.7 ± 12.3 (13)	54.9 ± 19.0** (13)	38.0 ± 19.5** (13)
1-22	102.8 ± 17.2 (13)	99.7 ± 14.4 (13)	82.5 ± 21.7* (13)	59.2 ± 24.4** (13)
1-29	135.0 ± 21.1 (13)	135.0 ± 16.6 (13)	116.5 ± 25.8 (13)	60.8 ± 32.8** (12)
1-36	166.6 ± 24.7 (13)	161.9 ± 21.1 (13)	147.0 ± 30.5 (13)	65.0 ± 34.5** (12)
1-43	190.2 ± 25.7 (13)	180.3 ± 24.3 (13)	170.8 ± 34.0 (13)	63.9 ± 39.6** (12)

*: significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 5

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats
Body weight of F₀ females during pre-mating period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
	0	12.5	50	200
Day of treatment				
1	242.9 $\pm$ 9.6 (13)	243.7 $\pm$ 12.0 (13)	242.9 $\pm$ 11.8 (13)	242.7 $\pm$ 14.5 (13)
8	259.7 $\pm$ 13.8 (13)	256.3 $\pm$ 12.4 (13)	251.8 $\pm$ 11.8 (13)	241.8 $\pm$ 12.6** (13)
15	270.9 $\pm$ 18.9 (13)	272.9 $\pm$ 10.9 (13)	263.9 $\pm$ 13.5 (13)	246.4 $\pm$ 17.8** (13)

** : significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 6

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Body weight gain of F₀ females during pre-mating period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
Dose (mg/kg)	0	12.5	50	200
Day of treatment				
1- 8	16.8 ± 6.3 (13)	12.6 ± 5.5 (13)	8.9 ± 8.2* (13)	-1.0 ± 6.7** (13)
8-15	11.2 ± 8.0 (13)	16.6 ± 9.4 (13)	12.1 ± 4.8 (13)	4.6 ± 7.9 (13)
1-15	28.0 ± 11.1 (13)	29.2 ± 8.6 (13)	21.0 ± 10.3 (13)	3.7 ± 7.3** (13)

*: significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 7

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Body weight of F₀ females during pregnancy period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
Dose (mg/kg)	0	12.5	50	200
Day of pregnancy				
0	280.6 ± 19.0 (13)	275.6 ± 14.0 (12)	275.2 ± 19.2 (13)	249.7 ± 20.1** (8)
7	318.6 ± 21.1 (13)	319.5 ± 15.4 (12)	318.1 ± 16.4 (13)	284.6 ± 22.7** (8)
14	353.2 ± 23.5 (13)	358.2 ± 19.7 (12)	358.1 ± 17.2 (13)	307.4 ± 27.9** (7)
20	429.8 ± 32.9 (13)	430.2 ± 28.1 (12)	436.8 ± 17.6 (13)	366.4 ± 32.5** (7)

**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 8

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Body weight gain of F₁ females during pregnancy period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
	0	12.5	50	200
Day of pregnancy				
0-7	38.0 $\pm$ 6.9 (13)	43.9 $\pm$ 5.8 (12)	42.9 $\pm$ 7.2 (13)	34.9 $\pm$ 10.2 (8)
7-14	34.6 $\pm$ 5.0 (13)	38.7 $\pm$ 6.7 (12)	40.0 $\pm$ 6.4 (13)	24.1 $\pm$ 10.3** (7)
14-20	76.6 $\pm$ 19.0 (13)	72.0 $\pm$ 17.6 (12)	78.6 $\pm$ 7.4 (13)	58.9 $\pm$ 14.6 (7)
0-14	72.5 $\pm$ 7.2 (13)	82.6 $\pm$ 9.2* (12)	83.0 $\pm$ 8.7* (13)	57.5 $\pm$ 10.7** (7)
0-20	149.1 $\pm$ 20.5 (13)	154.6 $\pm$ 23.3 (12)	161.6 $\pm$ 10.5 (13)	116.4 $\pm$ 19.1** (7)

*: significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 9

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Body weight of F₁ females during lactation period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
Dose (mg/kg)	0	12.5	50	200
Day of lactation				
0	316.8 ± 28.9 (12)	324.1 ± 25.6 (12)	329.7 ± 26.1 (13)	277.0 ± 31.8* (7)
4	347.6 ± 23.6 (12)	346.2 ± 34.5 (12)	355.9 ± 22.5 (13)	257.2 ± 43.9** (6)

*: significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 10

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Body weight gain of F₁ females during lactation period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
Dose (mg/kg)	0	12.5	50	200
Day of lactation				
0- 4	30.9 ± 17.4 (12)	22.1 ± 28.4 (12)	26.2 ± 15.8 (13)	-17.3 ± 19.1** (6)

** : significant difference from control. $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 11

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Food consumption of F₀ males (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
	0	12.5	50	200
Day of treatment				
1- 8	219.3 $\pm$ 19.1 (13)	205.9 $\pm$ 15.7 (13)	203.6 $\pm$ 20.0 (13)	184.0 $\pm$ 19.0** (13)
8-15	218.2 $\pm$ 18.7 (13)	204.4 $\pm$ 12.0 (13)	195.3 $\pm$ 19.9** (13)	200.7 $\pm$ 18.2* (13)
29-36	228.2 $\pm$ 16.6 (13)	222.9 $\pm$ 15.0 (13)	225.9 $\pm$ 21.6 (13)	175.2 $\pm$ 29.6** (12)
36-43	226.5 $\pm$ 11.8 (13)	213.0 $\pm$ 15.2 (13)	221.6 $\pm$ 19.7 (13)	169.5 $\pm$ 26.3** (12)

*: significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 12

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Food consumption of F₁ females during pre-mating period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
	0	12.5	50	200
Day of treatment				
1- 8	146.7 $\pm$ 12.3 (13)	147.8 $\pm$ 7.4 (13)	140.0 $\pm$ 10.0 (13)	126.9 $\pm$ 7.1** (13)
8-15	150.5 $\pm$ 14.1 (13)	154.7 $\pm$ 10.1 (13)	146.6 $\pm$ 10.9 (13)	140.7 $\pm$ 11.6 (13)

**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 13

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Food consumption of F₁ females during pregnancy period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
Dose (mg/kg)	0	12.5	50	200
Day of pregnancy				
0- 7	178.7 ± 14.5 (13)	185.9 ± 16.5 (12)	182.9 ± 11.8 (13)	176.6 ± 14.1 (8)
7-14	190.3 ± 12.3 (13)	201.8 ± 17.7 (12)	200.6 ± 10.6 (13)	173.0 ± 13.5* (7)
14-20	142.8 ± 8.1 (13)	145.4 ± 9.4 (12)	153.3 ± 7.0 (13)	129.3 ± 22.5 (7)

*: significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)

Table 14

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Food consumption of F₁ females during lactation period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
Dose (mg/kg)	0	12.5	50	200
Day of lactation				
0- 4	132.3 $\pm$ 27.2 (12)	121.9 $\pm$ 38.7 (12)	131.6 $\pm$ 26.5 (13)	46.1 $\pm$ 28.8** (6)

**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 15

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Macroscopical findings in individual male and females sacrificed or died in dosing period

Dose	200 mg/kg					
Sex	Female (FB04-)					Male (MX04-)
Animal No.	001	006	007	010	011	004
(Uterus)						
Macerate fetus	-	+	-	-	-	
(Lung)						
Area, pale	+	-	-	+	-	-
Area, dark	+	-	+	+	+	+
(Kidney)						
Dilatation, pelvis	-	+	-	-	-	-
(Urinary bladder)						
Dilatation	-	+	-	-	-	-

-, negative; +, positive.

Table 16

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Macroscopical findings in males at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg		12.5 mg/kg		50 mg/kg		200 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Epididymis)	[13]		[13]		[13]		[12]	
Nodule, pale, unilateral	11	2	13	0	13	0	11	1
Nodule, dark, unilateral	13	0	12	1	13	0	12	0
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[12]	
Area, pale	13	0	13	0	13	0	10	2
Area, dark	13	0	13	0	13	0	6	6
Spot, dark	13	0	13	0	13	0	11	1

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Macroscopical findings in females at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg		12.5 mg/kg		50 mg/kg		200 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Uterus)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Macerate fetus	12	1	13	0	13	0	8	0
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Area, pale	13	0	13	0	13	0	6	2
Area, dark	13	0	13	0	13	0	5	3

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 17

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Organ weight of F₀ males ; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MPA			
Dose (mg/kg)		0	12.5	50	200
Terminal body weight (g)		560.7 $\pm$ 33.1 (13)	551.6 $\pm$ 34.9 (13)	541.7 $\pm$ 46.1 (13)	432.4 $\pm$ 50.0** (12)
Testes (g)		3.38 $\pm$ 0.18 ^{a)} (13) 0.61 $\pm$ 0.04 ^{b)}	3.39 $\pm$ 0.19 (13) 0.61 $\pm$ 0.05	3.43 $\pm$ 0.26 (13) 0.64 $\pm$ 0.06	3.45 $\pm$ 0.30 (12) 0.81 $\pm$ 0.08**
Epididymides (g)		1.20 $\pm$ 0.07 (13) 0.22 $\pm$ 0.02	1.25 $\pm$ 0.05 (13) 0.23 $\pm$ 0.02	1.25 $\pm$ 0.08 (13) 0.23 $\pm$ 0.02	1.14 $\pm$ 0.09 (12) 0.27 $\pm$ 0.02**

a: absolute weight

b: relative weight (g per 100g body weight)

**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 18

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Histological findings in individual male and females sacrificed or died in dosing period

Dose	200 mg/kg					
Sex	Female (FB04-)					Male (MX04-)
Animal No.	001	006	007	010	011	004
(Ovary)						
Abnormality	-	-	-	-	-	
(Testis)						
Abnormality						-
(Epididymis)						
Abnormality						-
(Lung)						
Granuloma, foreign body / giant cell	++		++	+	++	-
Edema	+++		+++	+	+++	+++
Cellular infiltration, neutrophil	++		++	±	++	++
Cellular infiltration, macrophage	++		+	+	-	++
Mineralization, artery	±		-	-	-	-
Hemorrhage	-		-	-	-	+
(Bronchus)						
Cellular infiltration, neutrophil, lumen	++		+++	-	++	+++
Foreign body, lumen	+		++	-	+	++
(Kidney)						
Cellular infiltration, neutrophil, papilla		+				
Cast, proteinous		±				
(Urinary bladder)						
Hemorrhage, submucosa		±				

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

Table 19

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Histological findings in males at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						200 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Epididymis)	[13]						[12]					
Granuloma, sperm	13	0	0	0	0	0	10	0	2	0	0	2
(Testis)	[13]						[12]					
No abnormalities												
(Lung)							[7]					
Granuloma, foreign body / giant cell							4	0	0	3	0	3
Granuloma							6	0	1	0	0	1
Edema							6	0	1	0	0	1
Cellular infiltration, neutrophil							0	1	3	3	0	7
Cellular infiltration, macrophage							4	1	2	0	0	3
Mineralization, artery							6	1	0	0	0	1
Hemorrhage							5	1	1	0	0	2
(Bronchus)							[7]					
Cellular infiltration, neutrophil, lumen							5	2	0	0	0	2

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

Histological findings in females at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						200 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Ovary)	[13]						[8]					
No abnormalities												
(Lung)							[3]					
Granuloma, foreign body / giant cell							0	0	0	3	0	3
Edema							0	0	3	0	0	3
Cellular infiltration, neutrophil							0	0	3	0	0	3
Cellular infiltration, macrophage							0	0	2	1	0	3
Mineralization, artery							2	0	1	0	0	1
(Bronchus)							[3]					
Cellular infiltration, neutrophil, lumen							2	0	1	0	0	1
Foreign body, lumen							2	0	1	0	0	1

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

Table 20

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Summary of estrous cycles

Compound	MPA			
	0	12.5	50	200
Dose group (mg/kg)				
Number of females examined	13	13	13	13
Mean length of estrous cycle in days				
Pre-treatment period; Mean $\pm$ S.D.	4.0 $\pm$ 0.0 (13)	4.0 $\pm$ 0.0 (13)	4.0 $\pm$ 0.0 (13)	4.0 $\pm$ 0.0 (13)
Treatment period; Mean $\pm$ S.D.	4.0 $\pm$ 0.4 (13)	4.1 $\pm$ 0.3 (13)	4.0 $\pm$ 0.0 (13)	4.2 $\pm$ 0.4 (13)
Changes of estrous cycle after treatment				
Number of animals changed	2	1	0	3
Number of animals changed (pre-treatment period) (treatment period)				
4-day $\rightarrow$ 5-day	0	1	0	0
4-day $\rightarrow$ 4,5-day	1	0	0	2
4-day $\rightarrow$ irregular	1	0	0	1
Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean $\pm$ S.D.	1.0 $\pm$ 0.0 (13)	1.0 $\pm$ 0.0 (12)	1.0 $\pm$ 0.0 (13)	1.0 $\pm$ 0.0 (9)

Table 21

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Reproductive performance of animals

Compound Dose group (mg/kg)	MPA			
	0	12.5	50	200
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13 a)	13	9
Copulation index	100	100	100	69.2
Number of pregnant animals	13	13 a)	13	8
Fertility index	100	100	100	88.9
Pairing days until copulation				
Mean $\pm$ S.D. (N)	2.7 $\pm$ 1.4 (13)	1.8 $\pm$ 1.1 (12)b)	3.3 $\pm$ 3.4 (13)	2.8 $\pm$ 1.2 (9)

a): included the data of pregnant case that failed to confirm copulation

b): excluded the data of pregnant case that failed to confirm copulation

Copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs) $\times$ 100, %Fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs) $\times$ 100, %

Table 22

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Development of pups up to day 4 of lactation; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound Dose group (mg/kg)	MPA			
	0	12.5	50	200
Number of pregnant females	13	13 a)	13	7
Number of pregnant females with live pups	12	13 a)	13	7
Gestation index	92.3	100	100	100
Gestation length in days	22.4 $\pm$ 0.5 (12)	22.6 $\pm$ 0.5 (12)	22.6 $\pm$ 0.5 (13)	23.3 $\pm$ 0.5 ** (7)
Number of corpora lutea	16.8 $\pm$ 1.2 (13)	15.8 $\pm$ 2.4 (12)	17.3 $\pm$ 1.1 (13)	17.6 $\pm$ 1.9 (7)
Number of implantation sites	14.8 $\pm$ 4.4 (13)	14.3 $\pm$ 3.5 (12)	15.8 $\pm$ 1.7 (13)	15.3 $\pm$ 4.3 (7)
Implantation index	87.9 $\pm$ 25.1 (13)	89.3 $\pm$ 15.9 (12)	91.2 $\pm$ 9.1 (13)	87.1 $\pm$ 24.0 (7)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	15.5 $\pm$ 1.6 (12)	13.1 $\pm$ 3.4 (12)	14.1 $\pm$ 2.5 (13)	10.3 $\pm$ 4.3 (7)
Delivery index	96.9 $\pm$ 5.0 (12)	92.1 $\pm$ 9.2 (12)	89.3 $\pm$ 12.3 (13)	68.0 $\pm$ 18.3 ** (7)
Number of live pups	15.3 $\pm$ 1.3 (12)	12.9 $\pm$ 3.4 (12)	13.6 $\pm$ 2.8 (13)	8.4 $\pm$ 4.4 ** (7)
Birth index	96.0 $\pm$ 5.3 (12)	91.0 $\pm$ 9.0 (12)	86.4 $\pm$ 15.7 (13)	57.3 $\pm$ 24.3 ** (7)
Live birth index	99.1 $\pm$ 3.0 (12)	98.9 $\pm$ 2.6 (12)	96.5 $\pm$ 9.2 (13)	82.6 $\pm$ 22.4 * (7)
Sex ratio on day 0	46.3 $\pm$ 8.7 (12)	53.1 $\pm$ 16.1 (12)	49.0 $\pm$ 12.9 (13)	52.6 $\pm$ 17.3 (7)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	15.3 $\pm$ 1.2 (12)	12.8 $\pm$ 3.3 (12)	13.6 $\pm$ 2.8 (13)	6.3 $\pm$ 6.0 ** (6)
Viability index	99.5 $\pm$ 1.7 (12)	99.5 $\pm$ 1.8 (12)	100.0 $\pm$ 0.0 (13)	61.0 $\pm$ 47.9 ** (6)
Sex ratio on day 4	46.7 $\pm$ 9.2 (12)	58.2 $\pm$ 15.8 (12)	49.0 $\pm$ 12.9 (13)	58.9 $\pm$ 12.2 (4)

Gestation index = (number of pregnant females with live pups / number of pregnant females) $\times$ 100, %Implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea) $\times$ 100, %Delivery index = (number of pups born / number of implantation sites) $\times$ 100, %Birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantation sites) $\times$ 100, %Live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born) $\times$ 100, %Sex ratio on day 0 = (number of male live pups on day 0 / number of live pups on day 0) $\times$ 100, %Viability index = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 0) $\times$ 100, %Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 / number of live pups on day 4) $\times$ 100, %* :Significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)** :Significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

a):Included data of one pregnant animal that failed to confirm copulation

Table 23

Preliminary reproduction toxicity screening test of MPA by oral administration in rats

Body weight of pups up to day 4 of lactation; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	MPA			
	0	12.5	50	200
Day 0 of lactation				
Weight of pup (g)				
Male	6.8 $\pm$ 0.6	7.4 $\pm$ 0.9	7.1 $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 0.9 *
Female	6.4 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 0.7	6.7 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 0.8 *
Day 4 of lactation				
Weight of pup (g)				
Male	10.6 $\pm$ 1.5	11.9 $\pm$ 2.5	11.5 $\pm$ 2.0	8.7 $\pm$ 2.9
Female	10.1 $\pm$ 1.1	11.3 $\pm$ 2.4	11.1 $\pm$ 1.9	8.9 $\pm$ 3.0

* :Significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)