

最終報告書

表 題 : 2,4,6-トリニトロフェノールのラットにおける簡易生殖試験

試 験 番 号 : S R 0 4 2 1 9

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙-----	1
目次-----	5
要約-----	11
緒言-----	13
材料および方法-----	13
成績-----	25
考察-----	29
参考文献-----	30

Figures

1	Body weight changes of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	32
2	Food consumption of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	33
3	Body weight changes of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	34
4	Food consumption of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	35
5	Body weight changes of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2,4,6-trinitrophenol in rats (SR04219) -----	36

Tables

1	General appearance of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	37
2	Body weight changes of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	38
3	Food consumption of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	39
4	Gross findings of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	40

5	Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	41
6	Histopathological findings of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	42
7	Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	43
8	General appearance of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	47
9	Body weight changes during pre-mating days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	48
10	Body weight changes during gestation days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	49
11	Body weight changes during lactation days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	50
12	Food consumption changes during pre-mating days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	51
13	Food consumption changes during gestation days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	52
14	Food consumption changes during lactation days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	53
15	Gross findings of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	54
16	Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	55
17	Histopathological findings of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	56
18	Reproduction performance of parental rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	57
19	Pregnancy and litter data of rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) -----	58
20	General appearance of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2,4,6-trinitrophenol in rats (SR04219) -----	59
21	Body weight changes of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2,4,6-trinitrophenol in rats (SR04219) -----	60

22	Gross findings of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2,4,6-trinitrophenol in rats (SR04219) -----	61
----	---	----

要 約

2, 4, 6-トリニトロフェノールの0(対照群)、4、20および45 mg/kgを1群雄雌各12匹のCr1:CD(SD)ラットに、雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計 46 日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育 3 日までの期間経口投与し、その精腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖機能に及ぼす毒性および次世代の発生・発育に及ぼす影響について検討し、以下の成績を得た。

1. 親動物

- (1) 一般状態では、20および45 mg/kg 投与群の雄雌で濃黄色尿および被毛の着色が認められた。
- (2) 体重推移では、45 mg/kg 投与群の雄で投与期間中の体重増加量および体重増加率に有意な低値が認められた。
- (3) 摂餌量では、45 mg/kg 投与群の雄雌で投与期間の初期に有意な低値が認められた。
- (4) 剖検所見では、45 mg/kg 投与群の雄 1 例に盲腸の粘膜肥厚が認められた。
- (5) 器官重量では、45 mg/kg 投与群で雄雌の肝臓の相対重量、雄の腎臓の相対重量、雌の肝臓の絶対重量、雌の脾臓の絶対重量および相対重量にいずれも有意な高値が認められた。また、雄の精巣上体の絶対重量に有意な低値が認められた。
- (6) 病理組織学的検査では、20 および 45 mg/kg 投与群の雄各 1 例に左右精巣の軽度な精細管萎縮が、45 mg/kg 投与群の雄 2 例に左右精巣のステージ I X～X I における step19 精子細胞の遺残が認められた。

精子形成の Stage 分類では、45 mg/kg 投与群にステージ I ～VIにおけるパキテン期精母細胞に有意な低値が認められた。

2. 生殖発生毒性

- (1) 生殖能検査では、雌の性周期、雄雌の交尾率、受胎率、出産率および哺育 4 日の哺育率には各投与群とも被験物質投与に関連した変化は認められなかった。
- (2) 母動物の黄体数、着床痕数、分娩率、総出産児数、出産児の性比、哺育 0 日の生存児数、哺育 4 日の生存児数には、各投与群とも被験物質投与に関連した変化は認められなかった。
- (3) 新生児の一般状態、体重および剖検所見では、各投与群とも被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

以上のように、被験物質投与に関連した変化として、親動物で 20 mg/kg 投与群の雄 1 例に左右精巣の軽度な精細管萎縮がみられ、45 mg/kg 投与群では体重増加抑制を伴う摂餌量の低下、雄

1 例で盲腸の粘膜肥厚、雄雌で肝臓、腎臓および脾臓の重量増加が認められた。一方、雄では精巣上体の重量低下、1 例に左右精巣の軽度な精細管萎縮および2 例に左右精巣のステージ I X ～ X I における step19 精子細胞の遺残がみられたが、生殖能および次世代の発生・発育については各投与群とも被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

したがって、本試験条件下における 2, 4, 6-トリニトロフェノールの親動物における無影響量 (NOEL) は 4 mg/kg/day、親動物の生殖能および次世代の発生・発育に対する無影響量 (NOEL) はいずれも 45 mg/kg/day と考えられた。

緒 言

2, 4, 6-トリニトロフェノールの0(対照群)、4、20および45 mg/kgを1群雄雌各12匹のCr1:CD(SD)ラットに、雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計 46 日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育 3 日までの期間経口投与し、その精腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖機能に及ぼす毒性および次世代の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は、2, 4, 6-トリニトロフェノール[2, 4, 6-Trinitrophenol、別名：ピクリン酸、CAS No. : 88-89-1、純度：81.09%(乾燥後 100.0%:GC)：水分含量(18.91w/w%)より算出、含量実測値 100.0%(乾燥後)]で、分子式 $C_6H_3N_3O_7$ 、分子量 229.10、融点 122.5℃、水に微溶(溶液は酸性で鮮やかな黄色になる)の平たい針状結晶で輝黄色である。また、皮膚、その他動物の組織を黄色に染め、味はきわめて苦い。2, 4, 6-トリニトロフェノールは普通の金属(アルミニウムおよびスズを除く)と反応してピクリン酸塩を形成し、これは敏感できわめて爆発しやすいことから、冷蔵保存、金属容器は使用しない、火気厳禁の条件下で冷蔵庫内(実測範囲 2～7℃、受人から最終調製まで)に保存した(Appendix 1-1 および 1-2)。

なお、被験物質の水分含量を測定し、18.91 w/w%であることを確認した(Appendix 1-3)。

水分含量測定方法：

秤量瓶を乾燥させた後に重量を測定し、これに被験物質約 5 g を採取して秤量瓶ごとの風袋込み重量を測定した。これをシリカゲルの人ったデシケーターに入れ、アスピレーターで減圧後、室温で 9 日間保存して乾燥させ、再度風袋込み重量を測定して減量分から被験物質の水分含量を算出した。

$$\text{水分含量(\%)} = \frac{\text{乾燥前の全重量(g)} - \text{最終乾燥後の全重量(g)}}{\text{被験物質秤量値(g)}} \times 100$$

残余の被験物質の純度を、が分析し、試験期間中の保存安定性を確認した(Appendix 1-4)。

2. 媒体

0.1 % Tween 80 添加 0.5 % CMC-Na 水溶液を媒体とした。0.1 % Tween 80 添加 0.5 % CMC-Na 水溶液は、CMC-Na (日本薬局方カルメロースナトリウム、丸石製薬株式会社、ロット番号 5216) を精秤し、精製水(日本薬局方精製水、ヤクハン製薬株式会社、ロット番号 506062) 中に入れ CMC-Na が溶解した後、全調製量の 0.1vol%にあたる Tween80(ポリオキシエチレン ; Tween80 相当品、和光純薬工業株式会社、KLR6584)を添加して精製水でメスアップし、スターラーを用いて十分攪拌して調製した。0.1 % Tween 80 添加 0.5 % CMC-Na 水溶液を、被験物質の媒体および対照群の投与液とした。

調製日	0.1vol%Tween80 秤量値(g)	CMC-Na 秤量値(g)	媒体調製量 (mL)
2005 年 10 月 4 日	2	10.0001	2000
	2	10.0003	2000
2005 年 10 月 13 日	2	10.0000	2000
	2	10.0000	2000
2005 年 10 月 21 日	2	10.0001	2000
	2	10.0004	2000
2005 年 10 月 28 日	2	10.0000	2000
	2	10.0007	2000
2005 年 11 月 7 日	1	5.0001	1000
	2	10.0002	2000
	2	10.0000	2000
	1	5.0001	1000
2005 年 11 月 14 日	2	10.0003	2000
	2	10.0009	2000

3. 投与液の調製および化学分析

(1) 投与液の調製

被験物質を純度換算の上精秤し、所定の濃度となるように媒体(0.1 % Tween 80 添加 0.5 % CMC-Na 水溶液)に懸濁させた。調製の際には被験物質の皮膚への付着を避け、また、日に入らないように手袋、マスク、保護メガネ等を着用してクリーンベンチ内で注意して操作を行った。調製液は、調製後速やかに遮光気密容器に入れ、冷蔵庫内(実測範囲 3~7℃)で保存し、調製後 13 日以内に投与に用いた。残余の投与液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

調製日	調製濃度 (mg/mL)	被験物質秤量値 (g)	投与液調製量 (mL)
2005 年 10 月 4 日 濃度確認実施	4.5	6.6602	1200
	2.0	4.5 mg/mL→400 mL	900
	0.4	2.0 mg/mL→150 mL	750
2005 年 10 月 13 日	4.5	6.6601	1200
	2.0	4.5 mg/mL→400 mL	900
	0.4	2.0 mg/mL→150 mL	750
2005 年 10 月 21 日	4.5	6.6606	1200
	2.0	4.5 mg/mL→440 mL	990
	0.4	2.0 mg/mL→160 mL	800

2005 年 10 月 28 日	4.5	9.9904	1800
	2.0	4.5 mg/mL→600 mL	1350
	0.4	2.0 mg/mL→250 mL	1250
2005 年 11 月 7 日	4.5	9.9900	1800
	2.0	4.5 mg/mL→600 mL	1350
	0.4	2.0 mg/mL→250 mL	1250
2005 年 11 月 14 日 濃度確認実施	4.5	7.2100	1300
	2.0	4.5 mg/mL→240 mL	540
	0.4	2.0 mg/mL→200 mL	1000

(2) 投与液の化学分析

0.1 から 200 mg/mL の溶液について均一であること、室温保存下で 0.1 から 10 mg/mL の範囲で 8 日間安定であることが確認されている^リ。

本試験でも、0.4 および 4.5 mg/mL の被験物質調製液について、均一性ならびに室温保存 24 時間および冷蔵保存 8 および 15 日（調製時を 0 時間として起算）の安定性を確認した結果、0.4 および 4.5 mg/mL の調製液中で、上層・中層・下層における変動係数は 1.1% および 0.5% であり、また、残存率は室温保存 24 時間で 99.5 および 100.2%、冷蔵保存 8 日で 98.2 および 98.6%、15 日で 102.1 および 101.4% であった。この成績から、被験物質は調製液中で均一であり、かついずれの条件下でも安定であると考えられた（Appendix 2-1 および 2-2）。

初回および最終回調製時のすべての投与液について、被験物質の濃度を分析した結果、0.4、2 および 4.5 mg/mL 調製液の含有率は、所定の濃度に対して初回調製時で 93.8、97.5 および 98.9%、最終回調製時で 91.3、95.5 および 98.7% であった。これらの投与液はいずれも規定範囲とした 90～110% の範囲内にあり、かつ変動係数も 0.4～0.6% で規定の 5% 以内にあり、調製液の濃度は適正と考えられた（Appendix 2-3 および 2-4）。

(3) 濃度分析方法

標準溶液（表示濃度 約 5 μ g/mL：標準溶液濃度は表示濃度を水分含量で換算した値を使用）：約 50 mg の 2,4,6-トリニトロフェノールを 100 mL 容のメスフラスコに採取し、アセトニトリルで定容した。この液を正確に 1 mL 採取し、調製溶媒を加えて 100 mL とした（標準溶液）。調製は 1 回、注入は 3 回とした。調製後は冷蔵庫内で保存し、調製日にのみ使用した。

移動相：蒸留水 630 mL に 2-プロパノール 270 mL、アセトニトリル 100 mL およびトリフルオロ酢酸 1 mL を加え、十分に混合したものを移動相とした。調製後は室温で保存し、調製後 8 日以内に使用した（調製日を 0 日として起算）。

オートサンブラ洗浄液：蒸留水 63 mL に 2-プロパノール 27 mL およびアセトニトリル 10 mL を加え、十分に混合したものをオートサンブラ洗浄液および調製溶媒とした。調製後は室温で保存し、調製後 8 日以内に使用した（調製日を 0 日として起算）。

試料溶液の調製：被験物質調製液の採取点数は、濃度確認試験および安定性試験については被験物質調製液の中層から 3 点とし、均一性試験については被験物質調製液の上、中、下層から各 3 点の計 9 点とした。なお、均一性試験の中層の濃度を安定性試験の調製時の分析

結果とした。

各被験物質調製液を採取し、被験物質の濃度が表示濃度として 40～150 $\mu\text{g/mL}$ 付近となるようにアセトニトリルを加え、よく混合後、遠心分離(3500 回転/分、10 分、15℃)した。得られた上清を採取し、表示濃度として被験物質の最終濃度が 5 $\mu\text{g/mL}$ 付近となるように調製溶媒を加えたものを試料溶液とした。試料溶液の調製は 1 点につき 1 回、HPLC への注入は各 1 回とした。

HPLC システムおよび測定条件は以下の通りである。

HPLC システム

UV-VIS Detector	L-4200	株式会社 日立製作所
Intelligent Pump	L-6200	株式会社 日立製作所
Column Oven	L-5025	株式会社 日立製作所
Autosampler	AS-2000	株式会社 日立製作所
Degasser	ERC-3512	株式会社 エルマ
Millennium ³² Chromatography Manager	M32SW	日本ウォーターズ株式会社

測定条件

カラム	: CAPCELL PAK C18 UG120、4.6 mm I.D. × 150 mm (株式会社 資生堂)
移動相	: 蒸留水/2-プロパノール/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸 (630:270:100:1)
測定波長	: 238 nm
カラム温度	: 45℃
流量	: 1 mL/min
注入量	: 10 μL
オートサンプリング温度	: 10℃
分析時間	: 10 分
オートサンプリング洗浄液	: 蒸留水/2-プロパノール/アセトニトリル (63:27:10)

Millennium³² を用いて標準溶液のピーク面積と濃度から作成した検量線より、各試料溶液の濃度(以下、測定濃度)を求め、以下の式より調製液中の被験物質濃度、変動係数、含有率および残存率を算出した。

$$\text{被験物質濃度 (mg/mL)} = \frac{\text{測定濃度 (}\mu\text{g/mL)} \times \text{希釈係数}}{1000}$$

$$\text{変動係数 (\%)} = \frac{\text{被験物質濃度標準偏差}}{\text{被験物質濃度平均値}} \times 100$$

$$\text{含有率 (\%)} = \frac{\text{被験物質濃度平均値}}{\text{調製液の表示濃度}} \times 100$$

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{保存後の被験物質濃度平均値}}{\text{調製時の被験物質濃度平均値}} \times 100$$

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター生産の SPF Cr1:CD(SD) ラットを用いた。ラットはこの種の試験で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

雄雌各 57 匹を 2005 年 9 月 21 日に 8 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 250～286 g、雌で 162～194 g であった。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について 14 日間、一般状態観察を 1 日 1 回、さらに期間中に体重測定を 3 回実施した。雌については馴化期間中に 9 日間の性周期検査を実施した。検疫および馴化期間中、膈口肉柱が 1 例、性周期の不規則が 3 例認められ、これらの例は群分け前に試験系から除外した。

(3) 群分け

検疫および馴化期間終了後、健康な動物で、雌については性周期にも異常の認められない動物を雄雌各々 48 匹選抜して、10 週齢で試験に供した。検疫および馴化期間最終日(投与前々日)の体重に基づいて、層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行った。群分け時の動物の体重範囲は、雄で 328～394 g、雌で 208～243 g であり、平均体重(雄 368.3 g、雌 227.4 g)の±20%以内であった。選抜から外れた動物は試験から除外して安楽死とした。なお、選抜された動物について投与開始前日に一般状態および性周期の異常がないことを確認した。

(4) 動物およびケージの識別

動物は、群分け前は油性フェルトペンで尾部に印を付け、群分け後は耳介に動物番号を入墨し、個体識別を行った。出生児については、個体の識別は行わなかった。飼育ケージは、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに試験番号および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。群分け後はさらに試験群を明記し、雌動物には妊娠期間中は交尾成立日毎のグループ名および分娩予定日、哺育期間中は分娩終了日毎のグループ名も明記した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物は温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測範囲 $21 \sim 24^{\circ}\text{C}$)、湿度 $50 \pm 20\%$ (実測範囲 $38 \sim 64\%$)、換気回数 $10 \sim 15$ 回/時間、照明時間 12 時間(8:00~20:00、人工照明)の動物飼育室(307 号室)で飼育した。

2) 飼育器材および飼育方法

ブラケット式金属製金網床ケージ(260W×380D×180H, mm)に、検疫および馴化期間中は雄雌別に 1 または 2 匹、群分け後は 1 匹、交配中は雄雌各 1 匹、妊娠期間中は 1 母動物、哺育期間中は 1 腹を収容した。なお、交尾成立雌動物については妊娠 17 日から哺育 4 日まで小型受皿と共に実験動物用床敷(ホワイテフレーク、日本チャールス・リバー株式会社)を使用した。ケージおよび給餌器は群分け時に 1 回、その後は 2 週に 1 回交換した。受皿は週 2 回洗浄滅菌済みのものと交換した。自動給水装置の水抜きは週 1 回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、1 日 1 回実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を 1 週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製、 γ 線照射固型飼料 CRF-1 を、金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロット(050406、050609、050707)の飼料について分析した。汚染物質の分析は財団法人 日本食品分析センターにおいて、微生物検査は飼料製造業者がそれぞれ行った。分析データを飼料製造業者から入手し、異常のないことを確認した(Appendix 3-1-1~3-2-3)。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2005 年 7 月 1 日、2005 年 10 月 3 日および 2006 年 1 月 4 日に当該飼育室と同系統配管の最末端(306 号室)から試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社がを行い、分析データを入手し、異常のないことを確認した(Appendix 4-1~4-3)。

(6) 試験群の構成

試験群の構成と各群の動物番号を以下に示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数(動物番号)	
			雄	雌
対照群	0	0	12 (101～112)	12 (151～162)
低用量群	4	0.4	12 (201～212)	12 (251～262)
中用量群	20	2.0	12 (301～312)	12 (351～362)
高用量群	45	4.5	12 (401～412)	12 (451～462)

対照群には媒体(0.1 % Tween 80 添加 0.5 % CMC-Na 水溶液)を投与した。

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

既に実施されている 28 日間反復経口投与毒性試験¹⁾では、20 mg/kg で被毛の着色や尿中カリウムの低値等、100 mg/kg では精細管萎縮や精子の減少がみられ、NOEL は 4 mg/kg と報告されている。本試験では投与期間が 40 日を越え毒性が増強される可能性があること、また、妊娠動物を得る必要があることから、精細管萎縮や精子の減少のみられない 20 mg/kg を中用量とし、低用量には公比 5 で除した 4 mg/kg を高用量には公比 5 の $\sqrt{\quad}$ を乗じた用量の近似である 45 mg/kg を設定した。

2) 投与

被験物質がヒトに経口的に暴露される可能性を考慮し、OECD 試験法ガイドライン(421)に従って、1 日 1 回、雄については交配 14 日前より 46 日間、雌については交配前 14 日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間および哺育 3 日までの期間、9:00～14:00 の間に胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて強制的に胃内に経口投与した。

投与容量 10 mL/kg とし、各個体の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出した。

(8) 観察、測定および検査項目

I. 雄動物について

1) 一般状態観察

全例について、投与開始日を投与 1 日として起算し、投与 1 日から投与 46 日の翌日の剖検日まで、個々の動物の生死、外観、行動等について 1 日最低 2 回観察した。ただし、剖検日は午前中に 1 回観察した。

2) 体重測定

全例について、投与 1、2、5、7、10、14、その後は 7 日毎の投与前、投与終了日および剖検日に電子式上皿天秤 (GX-2000、株式会社 エー・アンド・デイ) を用いて測定し、1 g 単位で記録した。

以下の式により体重増加量および体重増加率を算出した。

$$\begin{aligned}\text{体重増加量 (g)} &= \text{投与 46 日体重 (g)} - \text{投与 1 日体重 (g)} \\ \text{体重増加率 (\%)} &= \frac{\text{体重増加量 (g)}}{\text{投与 1 日体重 (g)}} \times 100\end{aligned}$$

3) 摂餌量測定

全例について、交配期間および剖検日を除き、体重測定日と同じ日に実施した。各測定日に、電子式上皿天秤 (GX-2000、株式会社 エー・アンド・デイ) を用いて各ケージの給与量と残量を測定し、1 g 単位で記録した。以下の式により摂餌量を算出した。

$$\text{摂餌量 (g/day)} = \frac{\text{給与量 (g)} - \text{残量 (g)}}{\text{測定日間の日数 (day)}}$$

4) 剖検

全例について、投与 46 日の翌日に剖検した。体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、以下の器官・組織を 10% 中性緩衝ホルマリンに固定・保存した。肺は注入固定とした。なお、眼球およびハーダー腺はデビッドソン液で固定・保存し、精巣および精巣上体はブアン液で固定、70% エタノールに保存した。対の器官は左右とも保存した。

脳(大脳・小脳)、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む)、副腎、脾臓、心臓、胸部大動脈、舌、食道、胃(前胃および腺胃)、肝臓、脾臓、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、喉頭、気管、肺(気管支を含む)、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊および凝固腺、眼球およびハーダー腺、皮膚(原則として右腹部)、胸骨および大腿骨(骨髓を含む、右)、脊髓(頸部)、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、骨格筋(腓腹筋、右)および坐骨神経(右)

5) 器官重量測定

全例について、剖検時に電子式上皿天秤(ER-180A、株式会社 エー・アンド・デイ)を用いて以下の器官について重量を測定した。なお、左右の表示のある器官については、左右併せて測定した。

脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、精巣、精巣上体

以下の式により相対重量を算出した。

$$\text{相対重量(\%)} = \frac{\text{絶対重量(g)}}{\text{剖検日体重(g)}} \times 100$$

6) 病理組織学的検査

全例の精巣、精巣上体について標本作製を実施し、対照群および高用量群の全例について鏡検した。なお、精巣の精子形成の Stage 分類を実施し、高用量群で有意な差のみられた項目が認められたため、低用量群および中用量群についても実施した。他に、肉眼的異常部位を含む以下の標本作製および鏡検を行った。

器官・組織名	群(mg/kg)	動物番号
腎臓	0	111
盲腸	45	401

II. 雌動物について

1) 一般状態観察

全例について、投与開始日から剖検日まで、雄動物と同様に観察した。

2) 体重測定

投与開始日を投与 1 日、交尾成立日を妊娠 0 日、分娩終了日を哺育 0 日と起算し、投与 1、2、5、7、10、14 日の投与前、妊娠 0、1、3、5、7、10、14、17 および 20 日、哺育 0 および 1 日の投与前ならびに哺育 4 日(剖検日)に、電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社 エー・アンド・デイ)を用いて測定した。

以下の式により体重増加量および体重増加率を算出した。

交配前投与期間

$$\text{体重増加量(g)} = \text{投与 14 日体重(g)} - \text{投与 1 日体重(g)}$$

$$\text{体重増加率(\%)} = \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{投与 1 日体重(g)}} \times 100$$

妊娠期間

$$\text{体重増加量(g)} = \text{妊娠 20 日体重(g)} - \text{妊娠 0 日体重(g)}$$

$$\text{体重増加率(\%)} = \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{妊娠 0 日体重(g)}} \times 100$$

哺育期間

$$\text{体重増加量(g)} = \text{哺育 4 日体重(g)} - \text{哺育 0 日体重(g)}$$

$$\text{体重増加率(\%)} = \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{哺育 0 日体重(g)}} \times 100$$

3) 摂餌量測定

全例について、交配期間を除き、体重測定日と同じ日に雄と同様に実施した。ただし、妊娠 0 日および哺育 0 日は給餌量のみ測定した。

4) 剖検

分娩例は哺育 4 日に、妊娠 25 日まで分娩が認められない交尾成立例は妊娠 26 日の朝に雄動物と同様に剖検し、以下の器官・組織を 10% 中性緩衝ホルマリンに固定・保存した。なお、眼球およびハーダー腺はデビッドソン液で固定・保存した。

脳(大脳・小脳)、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む)、副腎、脾臓、心臓、胸部大動脈、舌、食道、胃(前胃および腺胃)、肝臓、脾臓、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、喉頭、気管、肺(気管支を含む)、腎臓、膀胱、卵巣、子宮(角部および頸部)、膈、眼球およびハーダー腺、乳腺および皮膚(原則として右腹部)、胸骨および大腿骨(骨髄を含む、右)、脊髄(頸部)、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、骨格筋(腓腹筋、右)および坐骨神経(右)。

5) 器官重量測定

全例について、剖検時に雄と同様に以下の器官について重量を測定し、相対重量を算出した。対の器官は左右併せて測定した。

脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、卵巣

6) 病理組織学的検査

雄の方法と同様に卵巣に関する病理組織学的検査を実施した。他に、肉眼的異常部位を含む以下の標本作製および鏡検を行った。

器官・組織名	群(mg/kg)	動物番号
胃	4	253
	45	461

III. 雄雌動物の生殖および新生児の発生について

1) 性周期検査

雌全例について、投与開始の 10 日前から交尾成立までの連日、ギムザ染色による膣垢塗抹標本作製し、光学顕微鏡下で性周期の各段階(発情前期、発情期、発情後期および発情休止期)の観察を行い、4 日から 6 日の間隔で 2 回以上繰り返すものを正常と判定し、発情期間隔を算出した。各段階の一部がみられない場合や同一の性周期段階が 3 日を超え継続してみられる場合を不規則、発情期あるいは発情休止期が 7 日以上継続してみられるものを連続発情または連続非発情とし、いずれも異常と判定した。その結果、連続非発情が各群に 1 例ずつ(対照群 No. 158、低用量群 No. 261、中用量群 No. 360、高用量群 No. 462)認められたが、いずれも交尾および妊娠が認められた。

2) 雄雌の生殖能検査

投与 14 日の夕方から、同試験群内の雄雌を 1 対 1 (動物番号末尾が同一動物) で最長 13 日間同居させた。交尾の成立は、膈内または受皿上に落下した膈栓、あるいは膈垢スメア標本中の精子が確認された場合とし、いずれかが認められた日を妊娠 0 日とした。妊娠成立の確認を、分娩の有無および剖検時に子宮内の着床痕の有無を調べることによって行った。

交尾率および受胎率を以下の式により群毎に算出した。

$$\text{交尾率 (Copulation index, \%)} = \frac{\text{交尾した雄雌対の数}}{\text{同居させた雄雌対の数}} \times 100$$

$$\text{受胎率 (Fertility index, \%)} = \frac{\text{受胎した雌数}}{\text{交尾した雄雌対の数}} \times 100$$

3) 分娩および哺育状態観察

交尾確認雌動物は全例自然分娩させた。分娩状態を、妊娠 21 日から最長 25 日まで毎日少なくとも 3 回 (9:00、13:00 および 17:00) 観察した。9:00 に母動物が児を巣の中に集めて腹の下に抱え込んでいるのを観察することによって分娩終了を確認し、その日を哺育 0 日とした。哺育 0 日に、腹毎に生存児数および死亡児数を数え、哺育状態、出産児の性別および外表を観察した。生存児数および死亡児数の合計を出産児数とした。児動物の性は、肛門と生殖突起の間の長さで判定した。各雌の卵巣の妊娠黄体数および子宮内の着床痕の数を肉眼的に数えて記録した。

妊娠期間を妊娠 0 日 (交尾成立日) から哺育 0 日 (分娩終了日) までの日数として算出した。

出産率、出生率、性比、分娩率、着床率および哺育 4 日の哺育率を以下の式により算出した。

$$\text{出産率 (Gestation index, \%)} = \frac{\text{生児出産雌数}}{\text{妊娠雌数}} \times 100$$

$$\text{出生率 (Live birth index, \%)} = \frac{\text{出産時生児数}}{\text{出産児数}} \times 100$$

$$\text{性比 (Sex ratio)} = \frac{\text{雄生産児数}}{\text{雄出産児数} + \text{雌出産児数}}$$

$$\text{分娩率 (Delivery index, \%)} = \frac{\text{出産児数}}{\text{着床痕数}} \times 100$$

$$\text{着床率 (Implantation index, \%)} = \frac{\text{着床痕数}}{\text{妊娠黄体数}} \times 100$$

$$\text{哺育率 (Nursing index, \%)} = \frac{\text{哺育 4 日に哺育児を持つ雌数}}{\text{生児出産雌数}} \times 100$$

4) 新生児の一般状態観察および生存率

全例について、哺育0日から哺育4日まで1日1回、生存および死亡を確認し、一般状態および外表について観察した。

観察結果から新生児生存率を以下の式により1腹単位で算出した。ただし、喰殺あるいは行方不明となった新生児は死亡例として扱った。

$$\text{新生児生存率 (Viability index, \%)} = \frac{\text{哺育4日の生存児数}}{\text{出産時生児数}} \times 100$$

5) 新生児の体重測定

全例について、哺育0、1および4日に電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社 エー・アンド・デイ)を用いて個体毎に測定し、0.1 g まで記録した。腹毎に雄雌別の平均体重を求めた。

6) 新生児の剖検

死亡例は発見後速やかに剖検し、whole body を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。生存例については、哺育4日に体外表(口腔内を含む)を観察後、二酸化炭素吸入法により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。異常が認められた個体は、whole body を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。

5. 統計学的方法

体重、体重増加量および増加率、摂餌量、器官の絶対重量および相対重量、発情期間隔、妊娠黄体数、着床痕数および着床率、出産児数、出産時の生存児数および死亡児数、分娩率、出生率、性比、妊娠期間、哺育4日の生存児数および新生児生存率の成績について群毎の平均値および標準偏差を算出し、項目毎に Bartlett の検定法を行い、等分散性を解析した。等分散($p > 0.05$)の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散($p \leq 0.05$)の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合($p \leq 0.10$)は Dunnett の検定法を用いて対照との比較を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合($p \leq 0.10$)は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照との比較を行った。

病理組織学的検査のうち2段階以上のグレードが認められた所見については、群毎の傾向を Kruskal-Wallis の検定法で解析し、有意差がみられた場合($p \leq 0.10$)は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照との比較を行った。

性周期の異常の発現率、交尾率、受胎率、出産率、哺育4日の哺育率、ならびに病理組織学的検査のうち1段階のグレードが認められた所見については、多試料 X^2 検定を行い、その結果有意差が認められた場合($p \leq 0.10$)には2試料 X^2 検定で対照との比較を行った。ただし、2試料 X^2 検定に不適合の場合には Fisher の直接確率検定法を用いた。

新生児の出生率、性比、新生児生存率および雄雌別体重は1腹を標本単位とした。

対照との比較検定については、有意水準は5%とした。なお、統計学的方法に関する表示方法を Individual data の冒頭に示す。

成 績

1. 親動物(雄)

(1) 一般状態

一般状態の成績を Table 1、INDIVIDUAL DATA 1-1～1-4 に示す。

対照群および 4 mg/kg 投与群では、投与期間中に全例に異常は認められなかった。

20 mg/kg 投与群では、濃黄色尿が投与 2 日に 12 例中 9 例、投与 3 日から全例に、また、被毛の着色が投与 7 日に 5 例にみられ、漸次増加し投与 15 日以降は全例に認められた。

45 mg/kg 投与群では、濃黄色尿が投与 1 日から全例に、また、被毛の着色が投与 6 日に 12 例中 10 例にみられ、漸次増加し投与 15 日以降は全例に認められた。

(2) 体重推移

体重推移を Figure 1、Table 2、INDIVIDUAL DATA 2-1～2-4 に示す。

4 および 20 mg/kg 投与群では、投与期間中に対照群と比較して有意な差は認められなかった。

45 mg/kg 投与群では、投与期間中に有意な差はみられなかったが、低値傾向で推移し、投与期間中の増加量および増加率は有意な低値を示した。

(3) 摂餌量

摂餌量を Figure 2、Table 3、INDIVIDUAL DATA 3-1～3-4 に示す。

4 および 20 mg/kg 投与群では、投与期間中に対照群と比較して有意な差は認められなかった。

45 mg/kg 投与群では、投与 2 および 5 日に有意な低値が認められたが、投与 7 日以降では有意な差は認められなかった。

(4) 剖検

剖検所見を Table 4、INDIVIDUAL DATA 4-1～4-4 に示す。

対照群では、12 例中 1 例(No. 111) に右腎臓の腎盂拡張が認められたが、他の例には異常所見は認められなかった。

4 および 20 mg/kg 投与群では、異常所見は認められなかった。

45 mg/kg 投与群では、12 例中 1 例(No. 401) に盲腸の粘膜肥厚が認められたが、他の例には異常所見は認められなかった。

(5) 器官重量

器官の絶対重量および相対重量を Table 5、INDIVIDUAL DATA 5-1～5-8 に示す。

4 および 20 mg/kg 投与群では、対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

45 mg/kg 投与群では、肝臓および腎臓の相対重量に有意な高値、さらに精巣上体の絶対重量に有意な低値が認められた。

(6) 病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 6、INDIVIDUAL DATA 6-1～6-4、病理組織学的所見の統計処理結果を INDIVIDUAL DATA 7-1～7-4、精子形成の Stage 分類の成績を Table 7、INDIVIDUAL DATA 8-1-1～8-4-4 に示す。

4 mg/kg 投与群および対照群では、精巣に異常所見は認められなかった。

20 mg/kg 投与群では、1 例 (No. 303) に左右精巣の軽度な精細管萎縮が認められた。

45 mg/kg 投与群では、1 例 (No. 401) に左右精巣の軽度な精細管萎縮が、2 例 (No. 402、410) に左右精巣のステージ I X～X I における step19 精子細胞の遺残が認められた。

精子形成の Stage 分類では、45 mg/kg 投与群にステージ I～VI におけるパキテン期精母細胞に対照群と比較して有意な低値が認められた。

他にも、4 および 20 mg/kg 投与群でプレプトテン期精母細胞等に有意な低値あるいは高値が認められたが、45 mg/kg 投与群には差は認められなかった。

なお、剖検時に腎盂拡張の認められた対照群の 1 例 (No. 111) の右腎臓には軽度な腎盂拡張が認められた。また、粘膜肥厚の認められた 45 mg/kg 投与群の 1 例 (No. 401) では、粘膜下組織の中等度の炎症が認められた。

2. 親動物(雌)

(1) 一般状態

一般状態の成績を Table 8、INDIVIDUAL DATA 9-1～11-4 に示す。

対照群および 4 mg/kg 投与群では、交配前、交配期間、妊娠期間および哺育期間いずれにも異常は認められなかった。

20 mg/kg 投与群では、濃黄色尿が投与 2 日に 12 例中 7 例、被毛の着色が投与 8 日に 2 例にみられ、いずれも漸次増加し、交配期間、妊娠期間および哺育期間には全例に認められた。

45 mg/kg 投与群では、濃黄色尿が投与 1 日から全例、被毛の着色が投与 8 日から全例にみられ、いずれも交配期間、妊娠期間および哺育期間を通して全例に認められた。

(2) 体重推移

体重推移を Figure 3、Table 9～11、INDIVIDUAL DATA 12-1～14-4 に示す。

各投与群とも、交配前、交配期間、妊娠期間および哺育期間のいずれにおいても体重推移、体重増加量および体重増加率に对照群と比較して有意な差は認められなかった。

(3) 摂餌量

摂餌量の変化を Figure 4、Table 12～14、INDIVIDUAL DATA 15-1～17-4 に示す。

4 および 20 mg/kg 投与群では、交配前、交配期間、妊娠期間および哺育期間のいずれにおいても对照群と比較して有意な差は認められなかった。

45 mg/kg 投与群では、交配前期間の投与 2～7 日に有意な低値がみられたが、交配期間、妊娠期間および哺育期間には有意な差は認められなかった。

(4) 剖検

剖検所見を Table 15、INDIVIDUAL DATA 18-1～18-4 に示す。

对照群では、異常所見は認められなかった。

4 mg/kg 投与群では、1 例(No. 253)で胃の境界縁に白色腫瘍が認められたが、他の例には異常所見は認められなかった。

20 mg/kg 投与群では、異常所見は認められなかった。

45 mg/kg 投与群では、1 例(No. 461、妊娠例)で胃の境界縁に白色腫瘍が認められたが、他の例には異常所見は認められなかった。

(5) 器官重量

器官の絶対および相対重量の成績を Table 16、INDIVIDUAL DATA 19-1～19-8 に示す。

4 mg/kg 投与群では、对照群と比較して有意な変化は認められなかった。

20 mg/kg 投与群では、卵巢の絶対重量に有意な高値が認められた。

45 mg/kg 投与群では、肝臓および脾臓の絶対重量および相対重量に有意な高値が認められた。

(6) 病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 17、INDIVIDUAL DATA 20-1～20-3 に示す。

45 mg/kg 投与群および对照群のいずれにも卵巢に異常は認められなかった。

なお、剖検時に白色腫瘍の認められた 4 mg/kg 投与群の 1 例(No. 253)および 45 mg/kg 投与群の 1 例(No. 461)の胃の境界縁ではいずれも軽度の扁平上皮嚢胞が認められた。

3. 生殖発生毒性

(1) 生殖能検査

生殖能検査の成績を Table 18、INDIVIDUAL DATA 21-1～22-4 に示す。

正常性周期を示す雌の出現率、発情期間隔、交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間および哺育 4 日の哺育率では各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

なお、非妊娠例が 45 mg/kg 投与群に 1 例 (No. 458) のみ認められたが、この例および交配相手の雄 (No. 408) の剖検所見および病理組織学的所見には異常は認められなかった。

(2) 妊娠、分娩、哺育状態および新生児生存率

妊娠、分娩、哺育状態および新生児生存率の成績を Table 19、INDIVIDUAL DATA 23-1～23-4 に示す。

黄体数、着床痕数、着床率、出生率、総出産児数、出産児の性比および哺育 4 日の生存児数、哺育 0 日の生存児数、新生児生存率、哺育 4 日の生存児数のいずれにも各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(3) 新生児の一般状態

新生児の一般状態の成績を Table 20、INDIVIDUAL DATA 24-1～24-4 に示す。

哺育 0 日から 4 日の間に死亡例 (不明例を含む) は、対照群に雄 1 例および雌 2 例、4 mg/kg 投与群に雄雌各 1 例、20 mg/kg 投与群に雄 3 例および雌 1 例、45 mg/kg 投与群に雄 1 例および雌 2 例にみられ、各群にミルクバンド (一) も散見された。

(4) 新生児の体重推移

新生児の体重推移を Figure 5、Table 21、INDIVIDUAL DATA 25-1～25-4 に示す。

各投与群の雄雌ともに対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(5) 新生児の剖検

新生児の剖検の成績を Table 22、INDIVIDUAL DATA 26～27-4 に示す。

死亡例では、対照群の雄雌各 1 例、45 mg/kg 投与群の雌 1 例に自己融解がみられたのみであり、他には各投与群ともに異常所見は認められなかった。

なお、20 mg/kg 投与群の雄雌各 1 例は不明例であり、剖検できなかった。

哺育 4 日の生存例では、45 mg/kg 投与群の雄 1 例にのみ肝臓の黄褐色化および外側左葉の暗赤色斑が認められた。

考 察

2, 4, 6-トリニトロフェノールの0(対照群)、4、20および45 mg/kgを1群雄雌各12匹のCr1:CD(SD)ラットに、雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計46日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育3日までの期間経口投与し、その精腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖機能に及ぼす毒性および次世代の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 親動物

一般状態では、濃黄色尿および被毛の着色が20および45 mg/kgの雄雌で投与初期から投与期間を通して認められたが、この変化は被験物質の特性(黄色)に伴うものであり毒性学的意義はないと判断した。他には被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

体重推移では、45 mg/kgの雄で投与期間中の体重増加量および体重増加率に有意な低値がみられ、被験物質投与に関連した増加抑制と考えられたが、雌では被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

摂餌量では、45 mg/kgの雌雄で投与期間の初期に、対照群と比較して雄で3～7 g、雌で2～3 gの有意な低下が認められ、この変化は雄で体重の低下を伴っていた。

剖検所見では、45 mg/kgの雄1例に盲腸の粘膜肥厚が認められ、この所見は、28日間反復経口投与毒性試験¹⁾で報告されている盲腸のびらんや潰瘍との関連性が考えられたが、同様の変化は雌には認められなかった。

4 mg/kg および 45 mg/kg の雌各 1 例で胃の境界縁に白色腫瘍が認められたが、いずれも各 1 例のみの発現でありしかも用量依存性がみられないことから、偶発的な変化と推察された。

器官重量では、45 mg/kg で雄雌の肝臓の相対重量、雌の肝臓の絶対重量、雌の脾臓の絶対重量と相対重量にいずれも有意な高値、また、雄の精巣上体に有意な低値が認められたが、これらの変化は28日間反復経口投与毒性試験¹⁾でも報告されており、今回認められた雄の腎臓の相対重量の有意な高値もあわせいずれも被験物質投与に関連した変化と考えられた。

一方、20 mg/kg の雌の卵巣の絶対重量の有意な高値については、用量相関性がみられないことから、被験物質投与との関連性はないと考えられた。

精巣、精巣上体および卵巣の病理組織学的検査では、20 および 45 mg/kg 投与群の雄各 1 例(No. 303、401)に軽度な精細管萎縮が、また、45 mg/kg 投与群の雄 2 例(No. 402、410)にステージ I X～X I における step19 精子細胞の遺残も認められた。精細管萎縮については、28日間反復経口投与毒性試験¹⁾でも報告されていることから、これらの変化は被験物質投与に関連した変化と考えられた。

一方、精子形成の Stage 分類では、45 mg/kg 投与群でステージ I～VI におけるパキテン期精母

細胞に対照群と比較して有意な低値が認められ、この変化も被験物質投与に関連した変化と考えられた。しかし、いずれの変化も軽度なものであり、また、これらの雄の交配相手の雌ではすべて妊娠が成立していることから、被験物質投与による影響は極軽微なものと考えられた。

2. 生殖発生毒性

生殖能では、各投与群ともに交尾率、受胎率、出産率等に変化はみられず、また雌の性周期等にも被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

妊娠、分娩および哺育状態では、各投与群ともに被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

新生児の検査でも、生存率、一般状態、体重推移および剖検所見に各投与群とも被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

以上のように、被験物質投与に関連した変化として、親動物で 20 mg/kg 投与群の雄 1 例に左右精巣の軽度な精細管萎縮がみられ、45 mg/kg 投与群では体重増加抑制を伴う摂餌量の低下、雄 1 例で盲腸の粘膜肥厚、雄雌の肝臓、雄の腎臓および雌の脾臓の重量増加が認められた。一方、雄では精巣上体の重量低下、1 例に左右精巣の軽度な精細管萎縮および 2 例に左右精巣のステージ I X ～ X I における step19 精子細胞の遺残がみられたが、生殖能および次世代の発生・発育については各投与群とも変化は認められなかった。

したがって、本試験条件下における 2, 4, 6-トリニトロフェノールの親動物における無影響量 (NOEL) は 4 mg/kg/day、親動物の生殖能および次世代の発生・発育に対する無影響量 (NOEL) はいずれも 45 mg/kg/day と考えられた。

参考文献

- 1) 山下 弘太郎 他、2, 4, 6-トリニトロフェノールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験。化学物質毒性試験報告。8, 238-251, 2001.

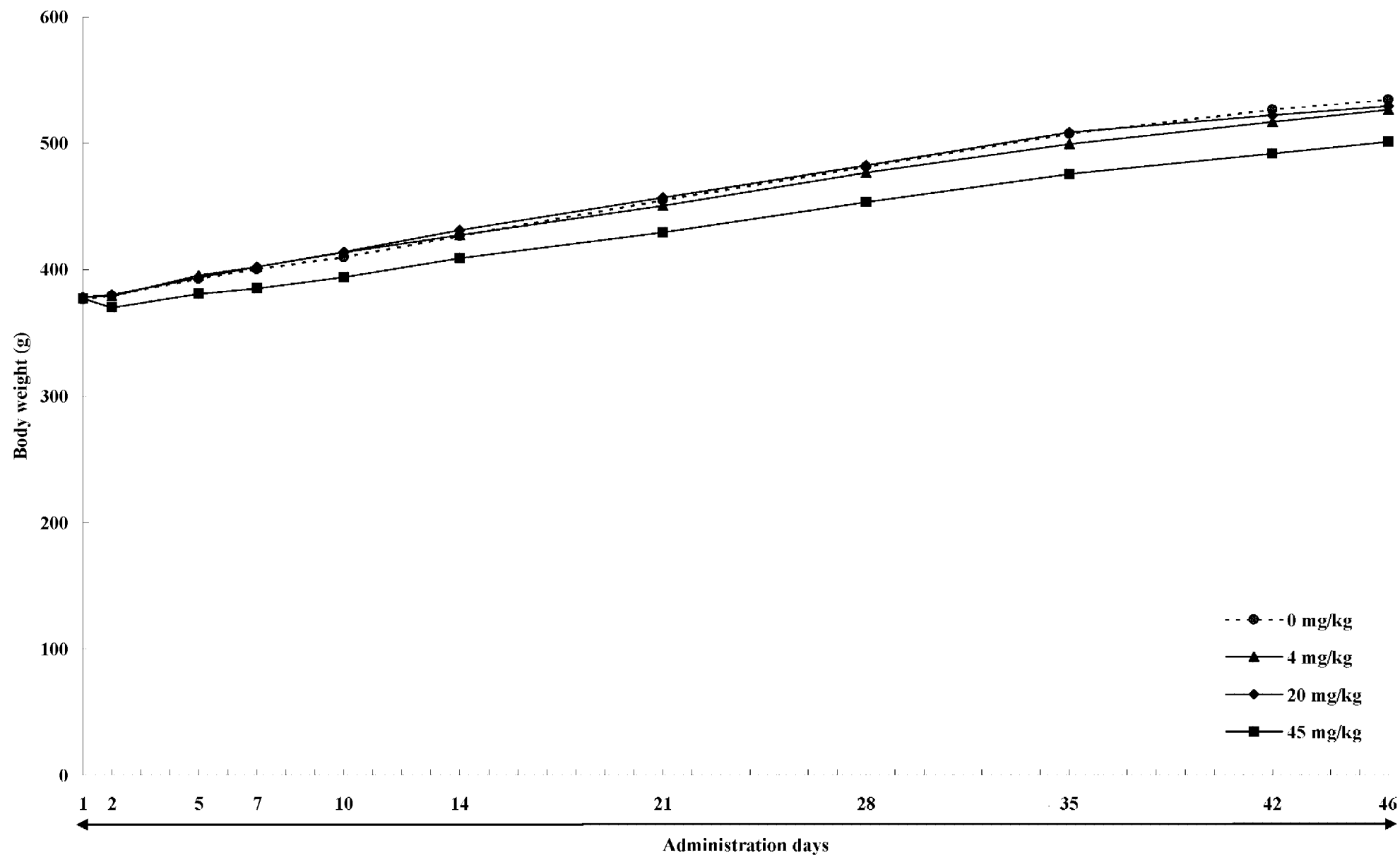


Figure 1 Body weight changes of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

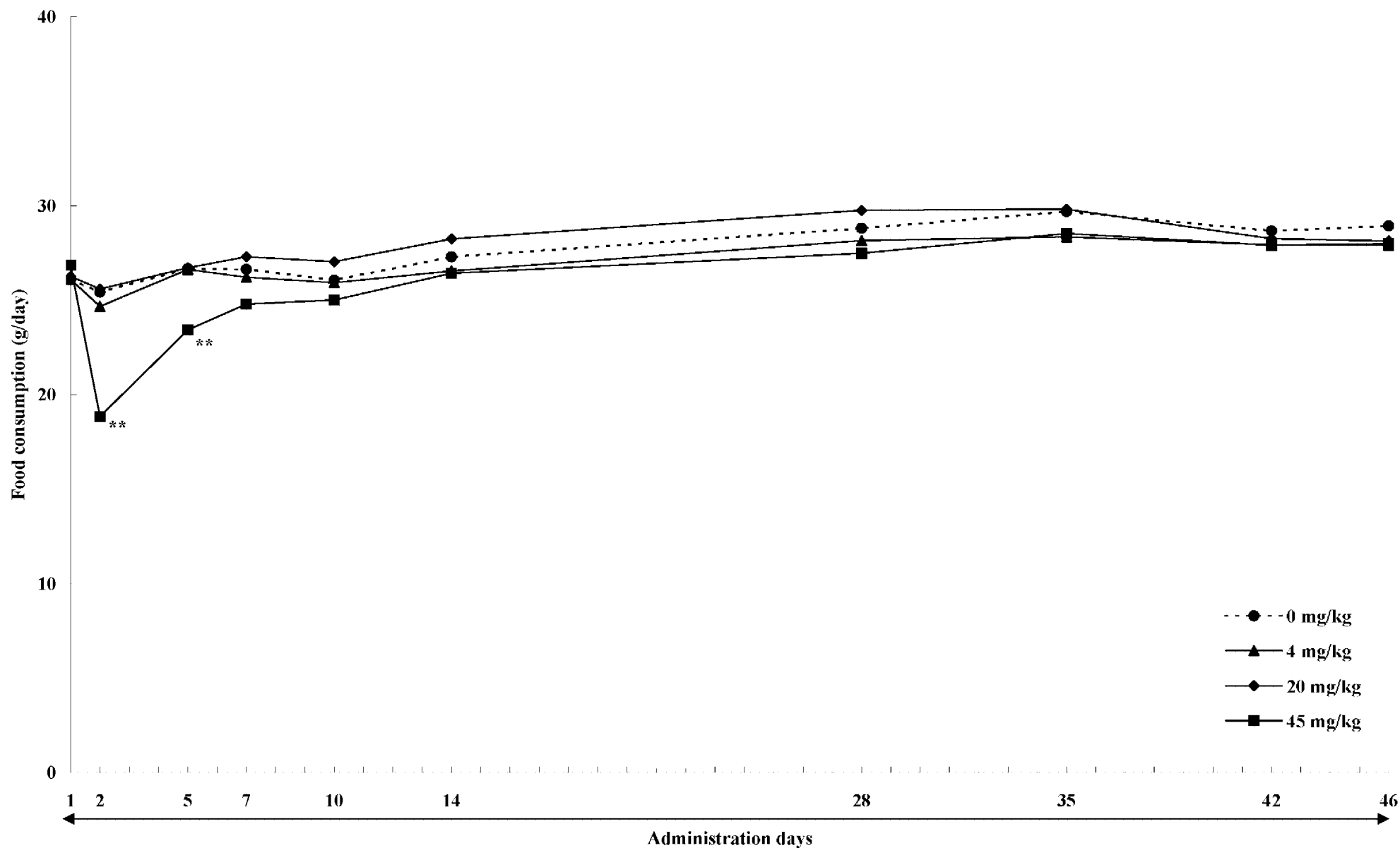


Figure 2 Food consumption of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$

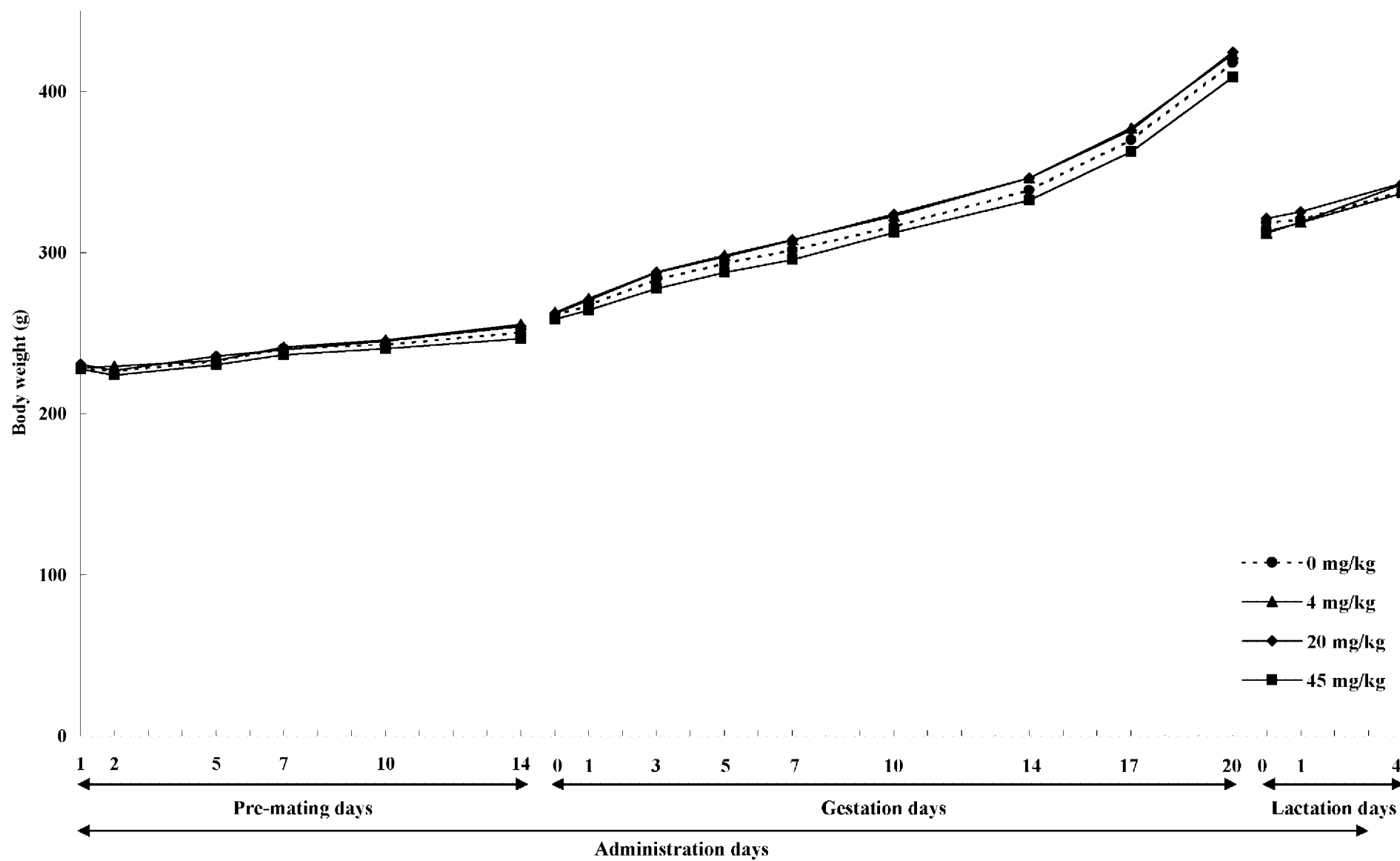


Figure 3 Body weight changes of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

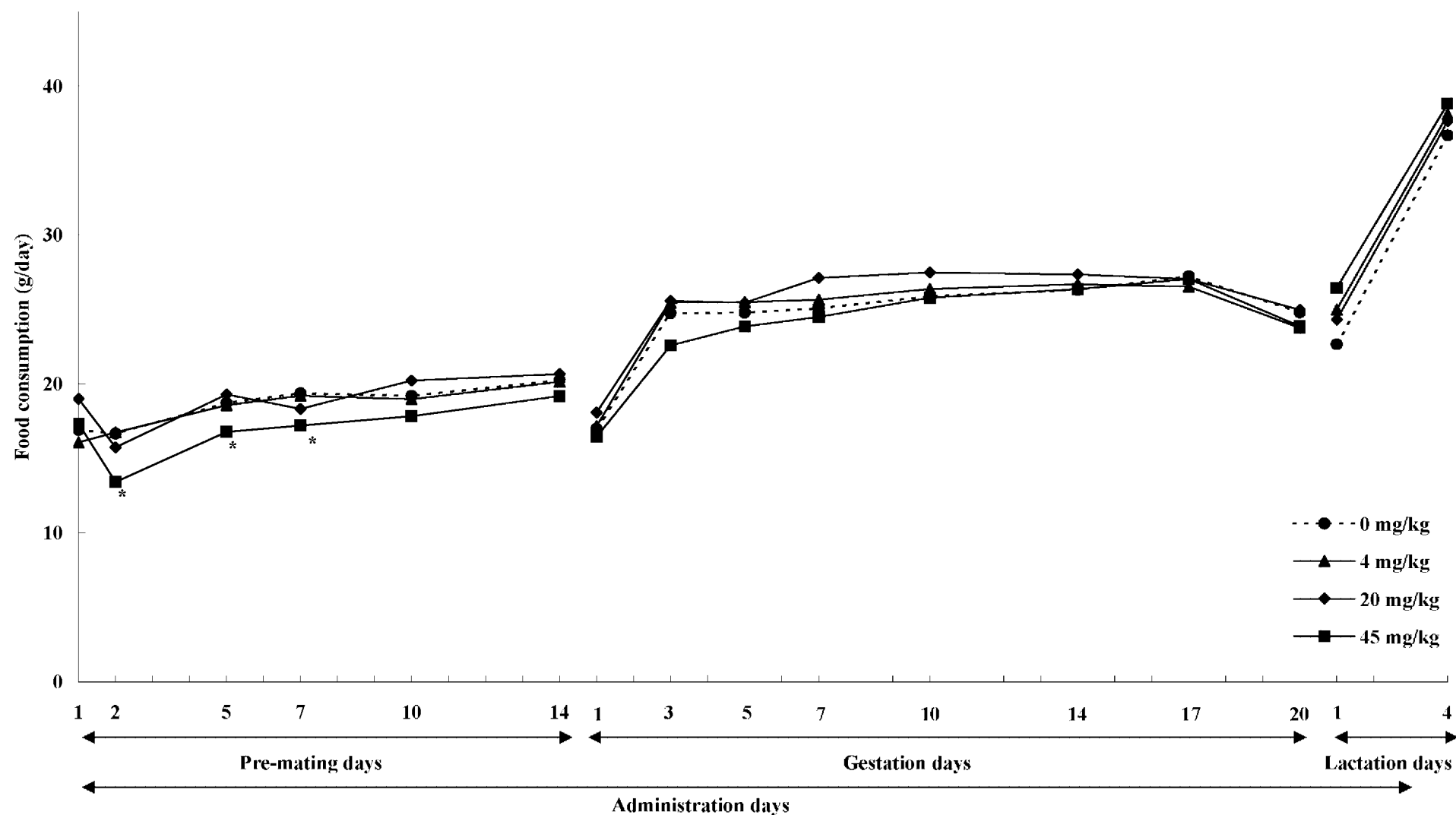


Figure 4 Food consumption of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$

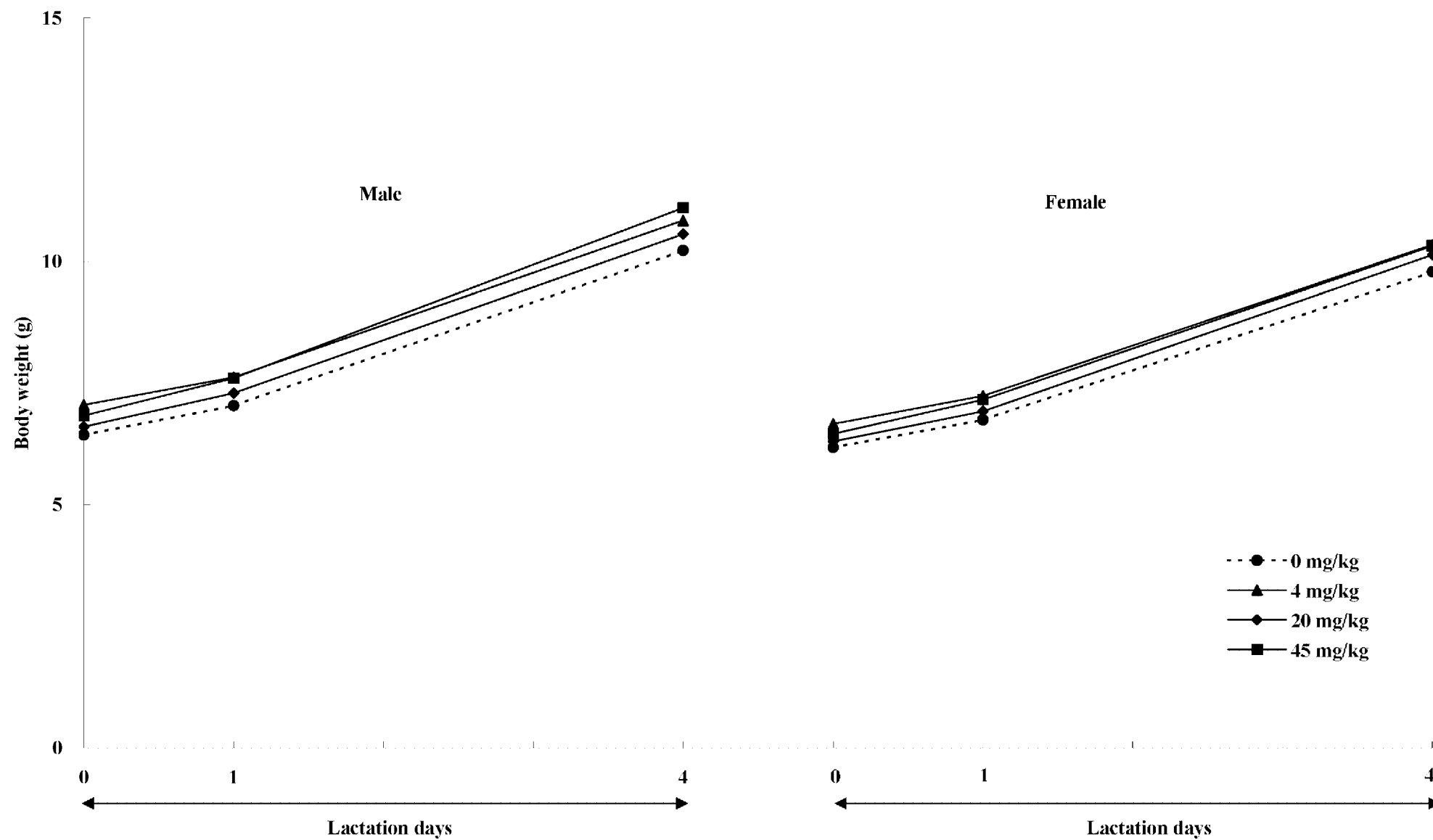


Figure 5 Body weight changes of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2,4,6-trinitrophenol in rats (SR04219)

Table 1 General appearance of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Findings	Administration days								Autopsy day
		1	2	3-5	6	7	8-9	10-14	15-46	
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12
4 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	12
20 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	3	0	0	0	0	0	0	0
	Dark yellow urine	0	9	12	12	12	12	12	12	12
	Staining of fur	0	0	0	0	5	8	11	12	12
45 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dark yellow urine	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Staining of fur	0	0	0	10	11	11	11	12	12

Values are number of animals with findings.

Table 2 Body weight changes of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Body weight (g) on administration days											Body weight gain	
														Day 1-46	
			1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46	g	%
0 mg/kg	12	Mean	376.3	379.4	393.1	400.3	409.8	426.8	454.8	481.5	507.5	526.6	534.3	158.0	41.884
		S.D.	20.6	20.2	24.0	24.8	27.3	29.6	32.8	35.0	40.1	43.2	42.1	26.1	5.743
4 mg/kg	12	Mean	378.3	379.1	395.6	402.2	413.6	427.5	450.8	476.7	499.3	516.8	526.4	148.2	39.118
		S.D.	15.7	16.6	20.4	22.0	22.0	24.7	24.5	27.2	29.2	34.9	32.2	20.8	4.784
20 mg/kg	12	Mean	378.3	380.0	393.7	402.3	413.9	431.2	457.2	482.7	508.5	522.3	529.4	151.2	40.003
		S.D.	19.8	21.3	22.4	23.0	24.8	28.4	28.1	31.7	32.4	32.8	34.6	24.7	6.418
45 mg/kg	12	Mean	377.3	370.0	380.9	385.0	393.9	409.0	429.6	453.5	475.7	491.9	501.2	123.9**	32.754**
		S.D.	17.9	15.0	19.7	21.4	22.9	25.8	28.4	31.9	36.6	38.9	38.3	25.7	6.133

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 1) x 100.

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$.

Table 3 Food consumption of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Food consumption (g/day) on administration days									
			1	2	5	7	10	14	28	35	42	46
0 mg/kg	12	Mean	26.08	25.42	26.66	26.63	26.05	27.28	28.80	29.68	28.66	28.93
		S.D.	3.00	1.93	2.60	2.60	2.33	2.36	2.70	2.83	2.62	2.07
4 mg/kg	12	Mean	26.08	24.67	26.62	26.21	25.92	26.53	28.15	28.34	27.92	27.90
		S.D.	1.88	2.15	2.35	2.03	1.77	2.22	2.35	2.22	2.64	2.17
20 mg/kg	12	Mean	26.25	25.58	26.71	27.29	27.03	28.23	29.75	29.81	28.25	28.13
		S.D.	2.14	3.15	1.66	1.79	1.84	1.62	1.87	1.90	1.36	2.17
45 mg/kg	12	Mean	26.83	18.83**	23.43**	24.79	25.00	26.42	27.47	28.53	27.90	27.98
		S.D.	3.13	3.10	3.02	2.33	2.29	2.64	2.38	2.45	2.45	2.39

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$.

Table 4 Gross findings of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

	Group	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	45 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
No abnormal findings		11	12	12	11
Organ : Findings					
Kidney : Dilatation, renal pelvis, unilateral		1	0	0	0
Cecum : Thickening, mucosa		0	0	0	1

Values are number of animals with findings.

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
0 mg/kg	12	Mean	538.8	19.016	3.524	3.486	0.649	0.840	0.154	1.505	0.278	2.227	0.415
		S.D.	44.4	2.279	0.221	0.244	0.039	0.136	0.021	0.164	0.018	0.046	0.031
4 mg/kg	12	Mean	526.8	17.757	3.367	3.537	0.671	0.787	0.150	1.462	0.278	2.187	0.417
		S.D.	36.2	1.809	0.207	0.303	0.038	0.139	0.026	0.166	0.022	0.067	0.025
20 mg/kg	12	Mean	533.7	18.957	3.554	3.581	0.674	0.808	0.152	1.475	0.277	2.212	0.416
		S.D.	35.6	1.598	0.226	0.244	0.055	0.062	0.011	0.135	0.019	0.092	0.030
45 mg/kg	12	Mean	503.2	19.584	3.893**	3.552	0.710*	0.863	0.173	1.413	0.281	2.179	0.435
		S.D.	38.5	1.861	0.194	0.355	0.078	0.109	0.026	0.154	0.025	0.080	0.031

Group	Number of animals		Thymus		Adrenal		Testis		Epididymis	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%
0 mg/kg	12	Mean	373.2	69.283	57.7	10.728	3.292	0.613	1.313	0.245
		S.D.	85.7	15.205	8.9	1.547	0.232	0.053	0.134	0.027
4 mg/kg	12	Mean	347.9	66.333	58.8	11.083	3.378	0.642	1.405	0.268
		S.D.	47.5	10.301	15.7	2.479	0.373	0.066	0.178	0.033
20 mg/kg	12	Mean	359.8	67.837	61.4	11.506	3.426	0.644	1.423	0.268
		S.D.	89.2	17.686	8.5	1.300	0.199	0.047	0.191	0.029
45 mg/kg	12	Mean	335.5	66.440	57.9	11.559	3.366	0.670	1.140*	0.228
		S.D.	82.4	13.926	6.5	1.429	0.380	0.061	0.139	0.028

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$.** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$.

Table 6 Histopathological findings of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Item		0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	45 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Cecum: Inflammation, submucosa	++	-	-	-	1 (1)
Kidney: Dilatation, renal pelvis	+	1 (1)	-	-	-
Testis: Atrophy, seminiferous tubule	+	0	0	1	1
Retention, step19 spermatid, stage IX X I	+	0	0	0	2
Epididymis: Abnormal findings		0	-	-	0

Values are number of animals with findings.

Values in parentheses are number of animals examined.

-: Blank value.

Grade; +: slight change, ++: moderate.

Table 7 Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Stage I-VI			
			Sertoli cells	Spermatogonia	Pachytene spermatocytes	Round spermatids
			Number ^a	Number ^a	Number ^a	Number ^a
0 mg/kg	12	Mean	21.43	17.25	51.62	144.63
		S.D.	1.76	2.18	3.54	9.83
4 mg/kg	12	Mean	21.95	16.22	50.80	134.65
		S.D.	1.59	1.83	2.01	7.90
20 mg/kg	12	Mean	20.95	15.48	51.25	143.02
		S.D.	2.11	2.58	3.73	15.34
45 mg/kg	12	Mean	19.78	17.10	48.25*	143.47
		S.D.	2.01	2.98	3.27	12.75

a : Expressed in number of cells in a seminiferous tubule.

(to be continued)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$.

Table 7 Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) (continued-1)

Group	Number of animals		Stage VII-VIII				
			Sertoli cells	Spermatogonia	Preleptotene spermatocytes	Pachytene spermatocytes	Round spermatids
			Number ^a	Number ^a	Number ^a	Number ^a	Number ^a
0 mg/kg	12	Mean	19.95	2.33	38.98	59.07	148.27
		S.D.	1.74	0.82	4.17	6.46	9.35
4 mg/kg	12	Mean	20.05	2.47	41.27	60.13	135.52*
		S.D.	2.25	0.37	3.23	3.18	8.96
20 mg/kg	12	Mean	21.28	2.23	43.20*	61.13	143.77
		S.D.	1.73	0.42	4.16	6.99	13.65
45 mg/kg	12	Mean	19.47	2.05	36.63	60.08	136.95
		S.D.	1.67	0.68	4.06	3.49	15.33

a : Expressed in number of cells in a seminiferous tubule.

(to be continued)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$.

Table 7 Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) (continued-2)

Group	Number of animals		Stage IX-XI			
			Sertoli cells	Spermatogonia	Leptotene spermatocytes	Pachytene spermatocytes
			Number ^a	Number ^a	Number ^a	Number ^a
0 mg/kg	12	Mean	23.62	4.57	44.95	66.15
		S.D.	1.49	1.11	3.67	5.65
4 mg/kg	12	Mean	22.67	4.83	43.30	60.52*
		S.D.	1.85	1.39	4.03	4.19
20 mg/kg	12	Mean	22.28	4.63	46.72	64.82
		S.D.	2.65	0.60	4.33	5.14
45 mg/kg	12	Mean	21.60	4.55	44.30	65.30
		S.D.	1.69	1.40	3.72	7.25

a : Expressed in number of cells in a seminiferous tubule.

(to be continued)

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$.

Table 7 Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219) (continued-3)

Group	Number of animals		Stage XII-XIV			
			Sertoli cells	Spermatogonia	Spermatocytes 1	Spermatocytes 2
			Number ^a	Number ^a	Number ^a	Number ^a
0 mg/kg	12	Mean	22.48	4.20	47.05	71.32
		S.D.	1.50	1.05	2.49	5.08
4 mg/kg	12	Mean	22.28	5.02	50.52	67.47
		S.D.	1.71	1.23	3.61	4.45
20 mg/kg	12	Mean	22.88	5.42*	50.60	70.42
		S.D.	1.75	1.17	5.52	5.89
45 mg/kg	12	Mean	21.20	4.30	47.00	68.43
		S.D.	1.82	1.11	3.76	3.84

a : Expressed in number of cells in a seminiferous tubule.

Spermatocytes 1 : Zygotene / Pachytene spermatocytes.

Spermatocytes 2 : Pachytene / Diplotene spermatocytes.

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$.

Table 8 General appearance of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Findings	Pre-mating days													Gestation days					Lactation days
		1	2	3-6	7	8,9	10-12	13,14	15	16	17	18	19-25	26	0	1	2-21	22	23-26	0-4
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	9	8	4	1	1	1	12	12	12	1	0	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	9	8	4	1	1	1	12	12	12	1	-	12
4 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	9	8	2	1	1	0	12	12	12	6	0	12
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	9	8	2	1	1	-	12	12	12	6	-	12
20 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	9	8	5	1	0	0	12	12	12	5	0	12
	No abnormal findings	12	5	3	2	2	1	1	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	-	0
	Dark yellow urine	0	7	9	10	10	11	11	9	8	5	1	-	-	12	11	12	5	-	12
	Staining of fur	0	0	0	0	2	5	6	9	8	5	1	-	-	12	12	12	5	-	12
45 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	12	12	10	8	5	1	1	1	12	12	12	6	1	11
	No abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dark yellow urine	12	12	12	12	12	12	12	10	8	5	1	1	1	12	12	12	6	1	11
	Staining of fur	0	0	0	0	12	12	12	10	8	5	1	1	1	12	12	12	6	1	11

Values are number of animal with findings.

- : Blank value.

Table 9 Body weight changes during pre-mating days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Body weight (g) on pre-mating days						Body weight gain	
			1	2	5	7	10	14	Day 1-14	
									g	%
0 mg/kg	12	Mean	227.8	226.3	232.8	240.3	242.7	250.5	22.7	10.077
		S.D.	12.3	9.9	12.1	10.4	11.5	11.4	9.6	4.479
4 mg/kg	12	Mean	228.3	229.3	232.8	241.3	245.8	255.3	27.0	11.857
		S.D.	6.7	7.1	7.8	8.8	7.8	8.2	6.6	3.018
20 mg/kg	12	Mean	230.6	226.8	235.5	239.8	245.1	254.1	23.5	10.134
		S.D.	9.8	10.8	10.6	9.6	13.3	16.3	9.2	3.808
45 mg/kg	12	Mean	227.8	223.8	230.3	236.5	240.3	246.6	18.8	8.290
		S.D.	11.6	13.1	12.4	12.1	13.9	14.4	8.7	3.926

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 1) x 100.

Table 10 Body weight changes during gestation days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Body weight (g) on gestation days									Body weight gain	
			0	1	3	5	7	10	14	17	20	Day 0-20	
												g	%
0 mg/kg	12	Mean	261.0	267.1	283.1	293.2	301.3	316.3	338.7	369.8	417.9	156.9	60.383
		S.D.	15.0	15.2	13.9	15.9	15.3	17.8	18.0	20.3	24.6	22.7	9.605
4 mg/kg	12	Mean	262.8	271.4	287.7	298.1	308.0	322.5	346.3	377.2	423.1	160.3	61.123
		S.D.	18.5	19.9	20.1	19.8	21.1	19.5	21.5	20.9	24.7	10.9	4.348
20 mg/kg	12	Mean	262.2	270.4	287.5	297.3	307.6	323.9	346.2	376.1	424.4	162.3	62.102
		S.D.	16.2	16.5	14.3	14.8	14.0	12.3	12.9	14.7	19.6	11.7	5.787
45 mg/kg	11	Mean	258.5	264.1	277.5	287.5	295.4	312.3	332.4	362.4	408.7	150.2	58.847
		S.D.	26.1	22.3	23.9	22.8	21.6	22.7	22.4	25.5	30.9	25.6	12.896

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 0) x 100.

Table 11 Body weight changes during lactation days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Body weight (g) on lactation days			Body weight gain	
			0	1	4	Day 0-4	
						g	%
0 mg/kg	12	Mean	318.3	320.3	338.1	19.8	6.409
		S.D.	23.4	21.3	17.6	12.3	4.256
4 mg/kg	12	Mean	312.1	318.8	342.3	30.2	9.927
		S.D.	27.1	21.5	22.2	13.0	4.549
20 mg/kg	12	Mean	321.2	325.3	343.1	21.9	7.017
		S.D.	19.9	17.2	15.9	14.2	4.930
45 mg/kg	11	Mean	312.8	318.5	336.7	23.9	7.745
		S.D.	19.6	20.4	16.7	6.6	2.472

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 0) x 100.

Table 12 Food consumption changes during pre-mating days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Food consumption (g/day) on pre-mating days					
			1	2	5	7	10	14
0 mg/kg	12	Mean	16.92	16.67	18.73	19.38	19.20	20.25
		S.D.	3.32	3.20	1.37	1.51	1.74	1.63
4 mg/kg	12	Mean	16.08	16.75	18.58	19.21	18.98	20.14
		S.D.	3.70	2.45	2.29	1.39	2.12	1.85
20 mg/kg	12	Mean	19.00	15.75	19.29	18.33	20.23	20.67
		S.D.	2.73	3.36	1.82	1.56	2.29	1.91
45 mg/kg	12	Mean	17.33	13.42*	16.78*	17.21*	17.84	19.19
		S.D.	3.34	3.00	1.69	2.35	1.63	1.53

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$.

Table 13 Food consumption changes during gestation days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Food consumption (g/day) on gestation days							
			1	3	5	7	10	14	17	20
0 mg/kg	12	Mean	17.00	24.75	24.79	25.08	25.88	26.32	27.23	24.81
		S.D.	2.37	2.90	3.44	3.00	3.17	3.01	3.00	2.38
4 mg/kg	12	Mean	17.17	25.46	25.50	25.67	26.38	26.70	26.54	23.77
		S.D.	2.55	2.29	3.72	2.40	2.82	2.38	1.37	1.40
20 mg/kg	12	Mean	18.08	25.58	25.46	27.13	27.49	27.36	27.05	24.98
		S.D.	3.03	2.01	2.18	2.08	1.93	1.50	2.06	1.83
45 mg/kg	11	Mean	16.45	22.59	23.86	24.50	25.79	26.37	27.05	23.88
		S.D.	3.08	2.70	2.35	2.06	2.30	2.24	2.06	2.29

Table 14 Food consumption changes during lactation days of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Food consumption (g/day) on lactation days	
			1	4
0 mg/kg	12	Mean	22.67	36.69
		S.D.	5.60	4.68
4 mg/kg	12	Mean	25.00	38.10
		S.D.	6.25	4.09
20 mg/kg	12	Mean	24.33	37.64
		S.D.	6.33	3.97
45 mg/kg	11	Mean	26.45	38.82
		S.D.	3.78	3.36

Table 15 Gross findings of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

	Group	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	45 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
Number of pregnant animals		12	12	12	11
No abnormal findings		12	11	12	10
Organ : Findings					
Stomach, limiting ridge : White mass		0	1	0	1
Number of non-pregnant animals		0	0	0	1
No abnormal findings		-	-	-	1

Values are number of animals with findings.

- : Blank value.

Table 16 Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
0 mg/kg	12	Mean	338.1	13.656	4.040	2.158	0.640	0.712	0.212	1.028	0.304	2.048	0.608
		S.D.	17.6	1.183	0.296	0.125	0.040	0.077	0.020	0.087	0.021	0.060	0.034
4 mg/kg	12	Mean	342.3	14.409	4.209	2.161	0.633	0.638	0.188	1.013	0.296	2.037	0.598
		S.D.	22.2	1.293	0.227	0.213	0.048	0.112	0.028	0.068	0.019	0.076	0.039
20 mg/kg	12	Mean	343.1	14.407	4.199	2.222	0.648	0.744	0.218	1.043	0.305	2.053	0.599
		S.D.	15.9	1.165	0.265	0.177	0.051	0.116	0.030	0.093	0.029	0.080	0.034
45 mg/kg	11	Mean	336.7	15.596**	4.635**	2.272	0.674	0.856**	0.255**	1.046	0.315	2.042	0.608
		S.D.	16.7	1.283	0.345	0.177	0.038	0.109	0.029	0.064	0.025	0.039	0.037

Group	Number of animals		Thymus		Adrenal		Ovary	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
0 mg/kg	12	Mean	267.7	79.049	79.6	23.585	106.0	31.423
		S.D.	61.4	16.635	13.1	3.910	11.5	3.694
4 mg/kg	12	Mean	259.6	75.429	79.7	23.347	106.2	31.001
		S.D.	69.2	17.196	10.5	3.218	17.7	4.669
20 mg/kg	12	Mean	281.5	82.080	79.7	23.258	121.6*	35.468
		S.D.	71.6	21.200	9.1	2.778	16.2	4.737
45 mg/kg	11	Mean	234.3	69.734	82.4	24.458	106.4	31.650
		S.D.	99.2	29.259	12.9	3.576	13.4	4.187

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$.** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$.

Table 17 Histopathological findings of female rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Item		0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	45 mg/kg
Number of animals examined		12	1	0	12
Organ: Findings	Grade				
Stomach, limiting ridge: Cyst, squamous cell	+	-	1	-	1 (1)
Ovary: Abnormal findings		0	-	-	0

Values are number of animals with findings.

Values in parentheses are number of animals examined.

-: Blank value.

Grade; +: slight change.

Table 18 Reproduction performance of parental rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Estrous cycle	Length (days)	Copulation index		Fertility	Gestation	Gestation length (days)	Nursing
	Normality		Male	Female	index	index		index
	Incidence (%)		Incidence (%)	Incidence (%)	Incidence (%)	Incidence (%)		Incidence (%)
0 mg/kg	11/12 (92)	4.09 0.22	12/12 (100)	12/12 (100)	12/12 (100)	12/12 (100)	22.1 0.3	12/12 (100)
4 mg/kg	11/12 (92)	4.09 0.30	12/12 (100)	12/12 (100)	12/12 (100)	12/12 (100)	22.5 0.5	12/12 (100)
20 mg/kg	11/12 (92)	4.09 0.30	12/12 (100)	12/12 (100)	12/12 (100)	12/12 (100)	22.4 0.5	12/12 (100)
45 mg/kg	11/12 (92)	4.05 0.12	12/12 (100)	12/12 (100)	11/12 (92)	11/11 (100)	22.5 0.5	11/11 (100)

Normal estrous cycle = (Number of female with normal estrous cycle / number of females examined) x 100.

Copulation index = (Number of animals with successful copulation / number of animals mated) x 100.

Fertility index = (Number of pregnant females / number of females with successful copulation) x 100.

Gestation index = (Number of females with live pups / number of pregnant females) x 100.

Nursing index = (number of females nursing live pups on lactation day 4 / number of females with live pups delivery) x 100.

Values are means and S.D.

Table 19 Pregnancy and litter data of rats dosed orally with 2,4,6-trinitrophenol in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR04219)

Group	Number of Pregnant animals		Number of corpora lutea	Number of implantation sites	Implantation index (%)	Delivery index (%)	Number of pups delivered	Sex ratio	Lactation day 0		Lactation day 4	
									Number of live pups	Live birth index (%)	Number of live pups	Viability index (%)
Pups data												
0 mg/kg	12	Mean	16.5	15.7	95.278	94.185	14.8	0.483	14.6	98.958	14.5	99.405
		S.D.	1.6	1.2	6.802	4.997	1.4	0.113	1.3	3.608	1.4	2.061
4 mg/kg	12	Mean	16.3	16.1	98.989	92.838	14.9	0.458	14.8	98.915	14.8	100.000
		S.D.	1.8	1.8	2.362	5.128	1.7	0.097	1.7	2.548	1.7	0.000
20 mg/kg	12	Mean	16.5	16.1	97.423	94.009	15.2	0.457	15.1	99.562	14.8	97.508
		S.D.	1.6	1.8	4.855	6.748	2.4	0.128	2.2	1.518	2.5	3.745
45 mg/kg	11	Mean	15.7	15.1	96.300	94.498	14.3	0.528	14.1	98.745	14.0	99.465
		S.D.	3.1	2.8	4.482	6.062	2.8	0.132	2.8	2.795	2.7	1.773

Implantation index = (Number of implantation sites / number of corpora lutea) x 100.

Delivery index = (Number of pups born / number of implantation sites) x 100.

Sex ratio = Number of male pups born / number of pups born.

Live birth index = (Number of live pups on lactation day 0 / number of pups born) x 100.

Viability index on lactation day 4 = (Number of live pups on lactation day 4 / number of live pups on lactation day 0) x 100.

Table 20 General appearance of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2,4,6-trinitrophenol in rats (SR04219)

Group	Findings	Male					Female				
		Lactation days					Lactation days				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
0 mg/kg	Number of pups examined	85	84	84	84	84	92	91	90	90	90
	No abnormal findings	84	84	84	84	84	90	90	90	90	90
	Death (milk-band negative)	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	Milk-band negative	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4 mg/kg	Number of pups examined	83	82	82	82	82	96	95	95	95	95
	No abnormal findings	81	82	82	82	82	94	95	95	95	95
	Death (milk-band negative)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Milk-band negative	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
20 mg/kg	Number of pups examined	84	83	80	80	80	98	98	97	97	97
	No abnormal findings	80	80	80	80	80	95	97	97	97	97
	Death (milk-band negative)	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lost	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	Milk-band negative	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0
45 mg/kg	Number of pups examined	81	80	80	80	80	76	75	75	75	74
	No abnormal findings	80	80	80	80	80	75	75	75	74	74
	Death (milk-band negative)	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0

Values are number of animals with findings.

Table 21 Body weight changes of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2,4,6-trinitrophenol in rats (SR04219)

Group	Number of litters		Male			Female		
			Body weight (g) on lactation days			Body weight (g) on lactation days		
			0	1	4	0	1	4
0 mg/kg	12	Mean	6.43	7.03	10.23	6.18	6.74	9.78
		S.D.	0.36	0.44	0.68	0.40	0.46	0.82
4 mg/kg	12	Mean	7.05	7.62	10.84	6.66	7.23	10.34
		S.D.	0.68	0.76	1.06	0.72	0.79	1.03
20 mg/kg	12	Mean	6.60	7.29	10.56	6.30	6.92	10.13
		S.D.	0.74	0.90	1.50	0.59	0.79	1.31
45 mg/kg	11	Mean	6.83	7.60	11.10	6.45	7.15	10.32
		S.D.	0.75	0.91	1.43	0.66	0.83	1.36

Table 22 Gross findings of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of 2,4,6-trinitrophenol in rats (SR04219)

Group	Male				Female			
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	45 mg/kg	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	45 mg/kg
Total number of pups examined	85	83	84	81	92	96	98	76
Findings of dead pups during day 0-4 of lactation								
Number of pups examined	1	1	4	1	2	1	1	2
No abnormal findings	0	1	3	1	1	1	0	1
Organ : Findings								
Autolysis	1	0	0	0	1	0	0	1
Not detected (lost)	0	0	1	0	0	0	1	0
Findings of pups euthanized on day 4 of lactation								
Number of pups examined	84	82	80	80	90	95	97	74
No abnormal findings	84	82	80	79	90	95	97	74
Organ : Findings								
Liver : Yellowish brown discoloration	0	0	0	1	0	0	0	0
Dark red patch, lateral left lobe	0	0	0	1	0	0	0	0

Values are number of pups with findings.

Symbols and process for statistical analysis in individual data

M/C: Values for Bartlett's test for homogeneity of variance,

$p \leq 0.05$ ----- > Kruskal-Wallis test

$p > 0.05$ ----- > One way analysis of variance

F : Values for one way analysis of variance,

$p \leq 0.10$ ----- > Dunnett's procedure

H : Values for Kruskal-Wallis test,

$p \leq 0.10$ ----- > Mann-Whitney's U-test

† : Significant difference, $p \leq 0.10$

* : Significant difference, $p \leq 0.05$

** : Significant difference, $p \leq 0.01$

t' : Values for Dunnett's procedure

U : Values for Mann-Whitney's U-test

* : Significant difference, $p \leq 0.05$

** : Significant difference, $p \leq 0.01$

X₂ : Values for chi-square test

p : Values for Fisher's exact probability test

* : Significant difference, $p \leq 0.05$

** : Significant difference, $p \leq 0.01$