

R-1058

最 終 報 告 書

試験表題：N-フェニル-1-ナフチルアミンのラットを用いた
経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：R-1058

試験期間：2010年7月6日~2011年7月7日

試験施設

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

試験委託者

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

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

1. 目次

1. 目次	3
3. 要約	9
3.1 雌雄動物に対する影響	9
3.2 生殖発生に対する影響	9
4. 緒言	10
5. 試験材料及び方法	11
5.1 被験物質及び媒体	11
5.1.1 被験物質	11
5.1.2 媒体	12
5.2 投与液の調製及び保存方法	12
5.2.1 投与液の調製及び保存	12
5.2.2 投与液の安定性	12
5.2.3 投与液の濃度確認	12
5.3 試験動物種及び系統の選択理由	13
5.4 試験動物	13
5.5 群分け	14
5.6 飼育条件	14
5.7 動物の識別	14
5.8 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由	15

5.9	投与方法	15
5.10	投与量及び群構成	15
5.11	投与量の設定根拠	15
5.12	観察及び検査の方法	16
5.12.1	一般状態の観察	16
5.12.2	体重測定	16
5.12.3	摂餌量測定	16
5.12.4	膣垢検査	16
5.12.5	交配方法	16
5.12.6	分娩及び哺育観察	17
5.12.7	出生児の観察及び測定	17
5.12.8	病理学検査	17
5.13	統計解析	18
5.13.1	パラメータの算出	18
5.13.2	検定	18
6.	試験結果	20
6.1	一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)	20
6.2	体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)	20
6.3	摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)	20
6.4	器官重量 (Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-8)	20
6.5	剖検所見 (Table 5-1、5-2、Appendix 5-1~5-96)	20
6.6	病理組織学検査 (Table 6-1~6-3、Appendix 5-1~5-96)	21
6.7	性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)	21
6.8	交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)	21
6.9	分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)	21
6.10	出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-4)	21
6.11	出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-4)	21
6.12	出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)	22
6.13	出生児の生後4日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)	22
7.	考察	23
7.1	雌雄動物に対する影響	23
7.2	生殖発生に対する影響	23
8.	文献	25

R-1058

図

Fig. 1、2	体重
Fig. 3、4	摂餌量

表

Table 1-1~1-4	一般状態
Table 2-1~2-4	体重
Table 3-1~3-4	摂餌量
Table 4-1、4-2	器官重量
Table 5-1、5-2	剖検所見
Table 6-1~6-3	病理組織学検査
Table 7	性周期
Table 8	交配成績
Table 9	分娩成績
Table 10	出生児の性比及び外表観察
Table 11	出生児の生存率
Table 12	出生児の体重
Table 13	出生児の生後4日剖検所見

3. 要約

N-フェニル-1-ナフチルアミンを 0（対照群：オリーブ油）、4、20 及び 100 mg/kg/day の投与量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 4 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に生殖発生毒性について概略的に検討した。

3.1 雌雄動物に対する影響

20 及び 100 mg/kg 投与群の雌雄において被験物質あるいはその代謝物の色調に由来すると考えられる暗紫色尿あるいは褐色尿がみられた。病理組織学検査では、20 mg/kg 投与群の雌雄及び 100 mg/kg の雌雄において小葉中心性肝細胞肥大が、100mg/kg 投与群の雄において脾臓に髓外造血の亢進及び褐色色素の沈着がみられ、これらの組織変化を反映したものと考えられる肝臓及び脾臓重量の増加がそれぞれ認められた。その他、100 mg/kg 投与群の雌 1 例には授乳期間中に自発運動の低下がみられた。

3.2 生殖発生に対する影響

性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。更に、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率に被験物質投与の影響は認められず、分娩及び哺育において被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

20 及び 100 mg/kg 投与群において出生日及び生後 4 日の雌雄出生児の体重が低値な傾向を示した。性比及び生後 4 日生存率に被験物質投与の影響は認められず、外表観察及び剖検において被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下における *N*-フェニル-1-ナフチルアミンの雌雄動物及び出生児に対する無影響量及び無毒性量はともに 4 mg/kg/day と推察され、一方、交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能並びに母体機能としての妊娠の維持、分娩及び哺育に対して本被験物質の 100 mg/kg/day 投与は影響を及ぼさないと考えられた。

R-1058

4. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室の委託により、*N*-フェニル-1-ナフチルアミンのラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験を実施したので、その成績を報告する。

R-1058

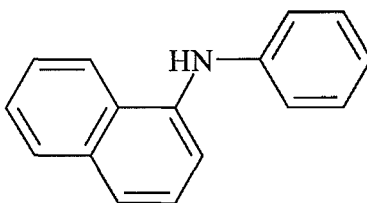
5. 試験材料及び方法

5.1 被験物質及び媒体

5.1.1 被験物質

N-フェニル-1-ナフチルアミンは 以下の情報とともに購入した。また、試験開始前に赤外吸収スペクトルの測定により特性が確認されている¹⁾。

名称 : *N*-フェニル-1-ナフチルアミン
英語名称 : *N*-Phenyl-1-naphthylamine
CAS 番号 : 90-30-2
官報公示整理番号 : 4-329
構造式又は示性式 :



分子式 : $C_{16}H_{13}N$
分子量 : 219.28
常温における性状 : 赤味の白色結晶性粉末

純度 (N より) : 99.8%
不純物 : 不明
融点 : 60.7°C
メタノール溶状 : 澄明
入手量 : 1000 g (500g ; 2 本)
保存方法 : 冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内 (許容温度 : 1~10°C、実測温度 : 2~8°C) に保存した。〕
保存場所 : 御殿場研究所被験物質保存室、生化学部標準物質保存場所及び第 2 研究棟 4 階被験物質調製室
取扱い上の注意 : 作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。
安定性 : 投与期間終了後、残余被験物質の赤外吸収スペクトルを確認した結果、実験実施前に確認した参照スペクトル¹⁾とほぼ同様であり、投与期間を通して被験物質は安定であったと判断した。

残量の処理 : 被験物質 5 g を保存試料として御殿場研究所被験物質保存室に保存した。動物試験及び分析終了後の残量は全て焼却処分した。

5.1.2 媒体

名称 : オリーブ油
 製造者 : 丸石製薬株式会社
 ロット番号 : 0628
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 御殿場研究所第 2 研究棟 4 階被験物質調製室

なお、媒体については、先に実施された「*N*-フェニル-1-ナフチルアミンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験」²⁾において投与液の媒体として用いられたオリーブ油を選択するとともに陰性対照物質として対照群の投与に使用した。

5.2 投与液の調製及び保存方法

5.2.1 投与液の調製及び保存

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に秤取し、媒体を加えて溶解した。本溶液をメスシリンダーに移し、更に媒体を加え規定濃度 (0.8、4 及び 20 mg/mL) となるよう調製した。投与液は、最大 5 日分を一括して調製し、1 日使用分ごと褐色ガラス瓶に小分けして冷所 (冷蔵庫内、許容温度: 1~10°C、実測温度: 4~8°C) に保存し、調製日を含め 7 日以内の投与に使用した。

5.2.2 投与液の安定性

本被験物質の 0.2 及び 20 w/v% 液 (媒体: オリーブ油) は、冷所 (2~6°C)、遮光下で 7 日間保存し、室温に 1 日放置した後、安定であったことが財団法人畜産生物科学安全研究所で確認されている²⁾。また、0.08 w/v% 液について、上記保存条件下における安定性を当施設で確認した¹⁾。

5.2.3 投与液の濃度確認

雄の投与 1 週と投与 6 週の 2 回、投与に用いる各濃度の投与液について、投与に使用する前に HPLC 法により濃度を確認した。その結果、規定濃度に対する各投与液の測定濃度の割合は 95.5~103.5% であり、いずれも許容範囲内 (濃度: 表示値に対する割合; 100.0±10.0%) であった。なお、濃度測定は当試験施設において確立された分析法¹⁾に従い、用いた標準物質、HPLC システム及び測定条件は以下の如くであった。分析法の概略を以下に示す。

R-1058

[標準物質]

被験物質の一部を標準物質として使用した。

[HPLC システム]

機器名及び型式		メーカー
HPLC	2695 セパレーションモジュール	Waters Corporation
検出器	2487 デュアルλ UV/VIS 検出器	
データ処理装置	Empower	

[HPLC 測定条件]

カラム : XTerra RP18 (4.6 mm × 150 mm、5 μm、
Waters Corporation)

カラム恒温槽設定温度 : 40°C

移動相 : 10 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.7) /
アセトニトリル (35:65、v/v)

流速 : 1.0 mL/min

検出 : UV (測定波長 254 nm)

注入量 : 10 μL

オートサンプラー内設定温度 : 10°C

5.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりげっ歯類を用いた試験が必要とされており、また、一般毒性試験、生殖発生毒性試験に広く用いられ、背景資料が豊富である系統を選択した。

5.4 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] の雌雄各 62 匹をそれぞれ 8 週齢で入手^{注)}し、入荷日を馴化 1 日と起算して、3 日間の検疫期間を含む 20 日間、馴化飼育した。その間、一般状態を毎日 1 回観察し、体重を馴化 1、3、8、15 及び 20 日に測定した。雌については、更に膣垢を馴化 4~17 日の間採取し、多数の角化上皮細胞から成る膣垢像を発情の指標とし、4~5 日の周期で回帰するものを正常として性周期異常の有無を調べた。その結果、雌 5 匹に性周期異常が認められたが、一般状態に異常は認められなかった。試験へは、性周期異常の認められた雌 5 匹を除く雌雄より、順調な体重推移を示した各 48 匹をそれぞれ選択して 10 週齢で使用した。

注) : 試験計画書に従い、動物発注数は雌雄各 60 匹であったが、実際には各 62 匹が納入された。

5.5 群分け

前項に記載された馴化中の観察、検査結果に基づいて選抜された雌雄各 48 匹は、群分け当日の体重により層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群に割付けた。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組み合わせ（ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた）で行った。群分けは投与開始前日に行った。投与開始時の体重は、雄で 394~467 g（平均体重：424 g）、雌は 219~268 g（平均体重：239 g）であり、雌雄とも平均値 $\pm$ 20%以内の体重範囲であった。群分けから除外された雄 14 匹及び性周期異常の雌 5 匹は投与開始翌日に試験から除外した。残りの雌 9 匹は交配用無処置動物として継続飼育したが、交配に用いなかったため、交配終了後、試験から除外した。

5.6 飼育条件

飼育は、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ （実測値：22~24 $^{\circ}\text{C}$ ）、相対湿度 $50\pm 20\%$ （実測値：44~71%）、換気回数 10~15 回/h、照明 12 時間/日（07:00~19:00）の動物飼育室（飼育室番号：802 号室）で行った。なお、飼育中に空調機の一時的な停止により、飼育室内の相対湿度の上昇がみられた。しかし、許容範囲を超えた時間は短く（約 5 分）、この間、動物に湿度上昇によると思われる異常はみられず、試験成績の信頼性に影響を及ぼす環境要因ではなかった。動物は、交配中を除いてブラケット式金属製網ケージ（W254×D350×H170 mm：リードエンジニアリング株式会社）へ個別に収容した。なお、妊娠 17 日から授乳 4 日までは、床敷（ホワイトフレーク：日本チャールス・リバー株式会社）を入れたプラスチック製エコンケージ（W340×D400×H185 mm：日本クレア株式会社）へ 1 腹ごと収容した。飼料は NMF 固形（放射線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：100415、100518、100611、100713）をステンレス製給餌器により自由に摂取させた。飲料水は水道水（御殿場市営水道水）自動給水装置又は給水瓶を用いて自由に摂取させた。飼料に関しては供試全ロットについて、床敷については、定期的（年 6 回）にそれぞれ Eurofins Scientific Analytice あるいは財団法人日本食品分析センターで実施された混入物質の分析結果を入手した。飲料水については、芝浦セムテック株式会社（旧社名：東芝機械環境センター株式会社）に定期的（年 4 回）に水質検査を依頼し、その結果を入手した。これらの検査結果より飼料、飲料水及び床敷中の混入物質が試験成績に影響を与える可能性のないことを確認した。

5.7 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に 3 桁の番号が連番で刻印された小動物用耳標をつけて行った。群分け後は、性別及び投与量ごと（対照群、低、中及び高用量の順）に 4 桁の番号をつけた。なお、1000 の位は群、100 の位は性（0 番を雄、1 番を雌）、10 と 1 の位は個体番号とした。飼育ケージには、投与量（群）ごとに色分けされ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、剖検予定日（雄）、交尾成立日（雌雄）及び分娩日（雌）を明記したラベルを付した。

5.8 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421 に準じ、経口投与を選択した。投与期間は、雄では交配前 14 日間、交配期間 14 日間、その後剖検前日までの 14 日間の計 42 日間、雌では交配前 14 日間、交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日までとした。なお、雌については 41~55 日間の投与期間となった。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 回/日（7 回/週）とした。

5.9 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与として一般的な強制経口投与とした。投与容量は 5 mL/kg 体重とし、1 日 1 回、08:44~12:21 の間にフレキシブル胃ゾンデを用いて投与液を投与した。ただし、投与時に分娩中であった動物は分娩終了を待って 13:51~15:12 の間に投与した。対照群には媒体（オリブ油）のみを同様に投与した。個体ごとの投与液量は、最近時の体重を基に mL 単位で小数第二位を四捨五入して算出した。

5.10 投与量及び群構成

投与量は 4、20 及び 100 mg/kg/day の 3 用量とし、対照群を加え 4 群構成とした。1 群当たりの動物数は雌雄各 12 匹とした。群構成表を Text table 1. に示した。

Text table 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	被験液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対 照 群	0	0	5	雄	12	1001~1012
				雌	12	1101~1112
低用量群	4	0.8	5	雄	12	2001~2012
				雌	12	2101~2112
中用量群	20	4	5	雄	12	3001~3012
				雌	12	3101~3112
高用量群	100	20	5	雄	12	4001~4012
				雌	12	4101~4112

5.11 投与量の設定根拠

本試験の投与量は、先に実施した「*N*-フェニル-1-ナフチルアミンのラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（投与量設定試験）」³⁾（投与量：100、300 及び 1000 mg/kg）の結果を参考に設定した。投与量設定試験では、1000 mg/kg 投与群において雌雄全例が死亡し、300 mg/kg 投与群で一般状態、体重、摂餌量、器官重量及び剖検所見に顕著な毒性変化がみられた。100 mg/kg 投与群では、雌雄の一般状態、雌の摂餌量及び雄の肝臓重量に被験物質投与による軽度な変化が認められた。また、28 日間反復投与毒性試験²⁾（投与量：4、20、100 及び 500 mg/kg）において、500 mg/kg 投与群で雄 1 例が死亡し、無影響量は雌雄とも 20 mg/kg/day との報告がある。したがって、簡易生殖毒性試験における投与量は、投与期間を考慮して毒性兆候が発現し、かつ、生殖に

耐え得ると予想される 100 mg/kg を高用量とし、以下公比 5 で除して 20 及び 4 mg/kg をそれぞれ中及び低用量に設定した。

5.12 観察及び検査の方法

試験日の起算は、投与開始日を投与 1 日、投与 1 日から 7 日を投与 1 週、交尾成立日を妊娠 0 日、分娩終了日を授乳 0 日とし、以下に示す項目について、それぞれ記載の時期に観察及び検査を実施した。

5.12.1 一般状態の観察

全個体について、投与期間中は毎日 3 回（投与前、投与直後及び投与約 2 時間後）、それぞれ体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態における異常の有無を観察した。ただし、本試験では尿の色調変化がみられたが、交配期間中及び妊娠 17 日以降では雌雄動物の同居のため、あるいは床敷の交換による母動物へのストレス回避の観点から尿の観察を実施しなかった。なお、妊娠期間中の手に持つての観察は、妊娠 0、7、14 及び 20 日に行った。

5.12.2 体重測定

全個体について、雄は投与 1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、42 日及び剖検日に、雌は投与 1、4、8、11、15 日、交配期間中週 2 回（火曜、金曜）、妊娠 0、4、7、11、14、17 及び 20 日、授乳 0 及び 4 日並びに剖検日に体重を測定した。なお、午後に分娩の終了が確認された個体の授乳 0 日の体重を除いて、体重は午前中の投与前に測定した。

5.12.3 摂餌量測定

全個体について、雄は投与 1、4、8、11、15、32、36、39 及び 42 日に、雌は投与 1、4、8、11 及び 15 日、妊娠 1、4、7、11、14、17 及び 20 日並びに授乳 2 及び 4 日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差を 1 日摂餌量として算出した。給餌量及び残餌量ともに午前中の投与前に測定した。

5.12.4 膣垢検査

雌の全個体について、投与開始翌日から交尾が認められるまで毎日膣垢を採取し、交配前投与期間中は 5.4 試験動物の項と同様に性周期異常の有無を調べるとともに発情回数及び発情から次の発情までの日数（性周期）を求めた。交配期間中は膣垢内の精子の有無を調べた。

5.12.5 交配方法

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

算して交尾までに要した日数を求めた。

5.12.6 分娩及び哺育観察

交尾が成立した雌動物は、妊娠 21 日から妊娠 25 日の午前まで 1 日 2 回（午前、午後）分娩の有無並びにその終了を確認し、交尾成立日より分娩終了までの間を妊娠期間として 1 日単位で求めた。分娩が終了した母動物については、胎盤及び羊膜の処理等を指標として分娩異常の有無を観察した後、授乳 4 日まで出生児を哺育させた。授乳期間中は児集め、営巣及び授乳の状態等を指標として哺育異常の有無を観察し、授乳 5 日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査（5.12.8 項）に供した。なお、妊娠 25 日の午前までに分娩が認められなかった 4 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：2101）は、当日エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査に供するとともに子宮の着床の有無を確認した。

5.12.7 出生児の観察及び測定

母動物の分娩終了日を出生日（生後 0 日）とみなし、出生児数及び死産児数を数え、外表異常の有無を観察した。出生児は性別を判定した後、体重を測定した。授乳期間中は毎日 1 回、死亡児の有無を観察した。なお、外表異常児はエーテル深麻酔により安楽死させ、リン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液で固定して保存し、死産児及び死亡児は廃棄した。

生後 4 日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ剖検を行い、体外表、胸部・腹部を含む器官・組織の異常の有無を肉眼的に調べた。なお、出生児の体重は個別に測定し、雌雄別に各腹の平均値を算出した。

5.12.8 病理学検査

5.12.8.1 剖検及び器官重量測定

最終投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させた後、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、母動物については黄体数及び着床痕数を数えた。更に、雌雄の肝臓及び脾臓並びに雄の精巣及び精巣上体については重量（絶対重量）を測定し、これらの器官について剖検日の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。なお、精巣及び精巣上体の重量については左右別々に測定し、その合計値で評価した。なお、授乳 3 日までに全ての出生児が死亡した母動物（動物番号：2104）についてはその時点で同様に検査を実施した。

5.12.8.2 病理組織学検査

全ての個体の肝臓及び脾臓、雄の精巣、精巣上体、前立腺及び精囊、雌の卵巣、子宮及び膈並びに肉眼的異常部位を個体識別部（耳標を装着した耳介）とともにリン酸

緩衝 10 vol%ホルマリン液で固定した（ただし、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後リン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液に置換した）。個体識別部を除くこれらの器官は、パラフィン包埋した後、切片とし、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色標本を作製した。鏡検は、対照群及び高用量群の全個体並びに妊娠 25 日の午前までに分娩が認められなかった 1 例（動物番号：2101）及び全ての出生児が死亡した 1 例（動物番号：2104）の肝臓、脾臓及び上記内部生殖器並びに全ての肉眼的異常部位について行った。なお、精巣/卵巣、精巣上体及び精嚢は両側を、子宮は両角部を鏡検した。また、高用量群において雌雄の肝臓及び雄の脾臓に被験物質投与の影響が認められたため、中及び低用量群の雌雄の肝臓並びに雄の脾臓についても鏡検した。

5.13 統計解析

5.13.1 パラメータの算出

以下の式により交尾率、授精率、受胎率及び出産率を群ごとに、妊娠期間、着床率、死産児率、外表異常率、出生率、生後 4 日生存率、生後 0 及び 4 日の性比を母動物ごとに算出した。なお、出生児の体重については母動物ごと雌雄別に平均値を求めた。

交尾率(%) = (交尾動物数/同居動物数) × 100

授精率(%) = (雌を妊娠させた雄の数/交尾した雄の数) × 100

受胎率(%) = (妊娠した雌の数/交尾した雌の数) × 100

妊娠期間(日) = 妊娠 0 日から分娩した日までの日数

出産率(%) = (出生児出産雌数/妊娠雌数) × 100

着床率(%) = (着床痕数/黄体数) × 100

死産児率(%) = (死産児数/出生児数及び死産児数) × 100

外表異常率(%) = (外表異常児数/出生児数) × 100

出生率(%) = (出生児数/着床痕数) × 100

生後 4 日生存率(%) = (生後 4 日生存児数/出生児数) × 100

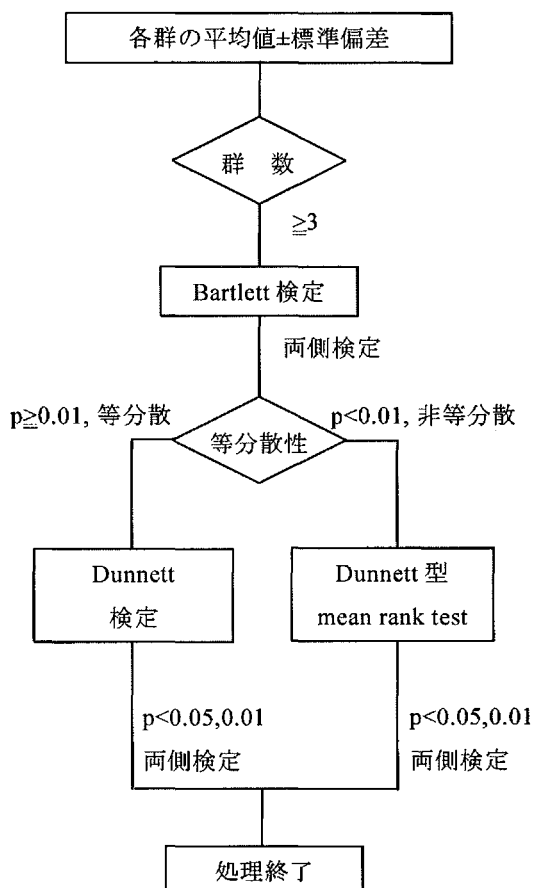
生後 0 日の性比 = 雄出生児数/出生児数

生後 4 日の性比 = 生後 4 日の雄生存児数/生後 4 日の生存児数

5.13.2 検定

データは対照群と各用量群との差について統計学的有意性の検定を行った。

体重、体重増加量（雄：投与 1~42 日、雌：投与 1~15 日、妊娠 0~20 日及び授乳 0~4 日、出生児：生後 0~4 日）、摂餌量、発情期像発現回数、性周期（発情周期）、交尾までに要した日数、妊娠期間、黄体数、着床痕数、生存児数、性比（生後 0 及び 4 日）及び器官重量（含、剖検時体重）は、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、次に示す模式図の方法に従って検定した。なお、交配期間中の雌の体重データ及び分娩し得なかった雌動物並びに全児死亡母動物の器官重量データは統計解析より除外した。



着床率、死産児率、外表異常率、出生率及び生後 4 日生存率については、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、Dunnett 型 mean rank test により平均順位の差の検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った。

交尾率、授精率、受胎率、出産率は、各群の交尾動物数、雌を妊娠させた雄動物数、妊娠雌動物数、生存児出産雌動物数より算出し、Fisher の直接確率計算法により検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った。

6. 試験結果

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

暗紫色尿あるいは褐色尿が20 mg/kg 投与群の雄で1~6例、雌で1又は2例、100 mg/kg 投与群の雄で8~全例、雌で3~11例に認められた。授乳期間中、100 mg/kg 投与群の1例（動物番号：4106）には自発運動の低下が授乳4及び5日に認められた。哺育状態に関して、4及び20 mg/kg 投与群の各1例（動物番号：2104、3112）に哺育行動の低下が授乳1日以降に認められ、4mg/kg 投与群の1例では授乳3日までに全ての出生児が死亡した。一方、20 mg/kg 投与群の1例については哺育行動の低下は授乳1日に一過性に認められたに過ぎなかった。4及び20 mg/kg 投与群で認められた哺育行動の低下は、100 mg/kg 投与群の哺育状態に異常は認められないことから偶発的な変化と考えられた。その他、妊娠25日の午前までに分娩が認められなかった4 mg/kg 投与群の1例（動物番号：2101）に後肢の腫脹及び口腔周囲被毛の汚れが認められたが、20及び100 mg/kg 投与群では同様な変化は認められず、偶発的な変化と考えられた。

6.2 体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)

20 mg/kg 投与群の雌において、交配前投与期間中の体重増加量が対照群に比べ有意な高値を示した。しかし、100 mg/kg 投与群では雌雄とも投与期間中を通して対照群と同様な体重推移を示し、20 mg/kg 投与群の雌における体重増加量の高値は用量との関連のない変化であり、偶発的な変動と考えられた。

6.3 摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)

4 mg/kg 投与群の雌において、投与8日の摂餌量が対照群と比べ有意な低値を示し、20 mg/kg 投与群の雌において、投与15日の摂餌量が有意な高値を示した。しかし、100 mg/kg では雌雄とも対照群と同様な摂餌量を示し、4及び20 mg/kg 投与群の雌における摂餌量の低値及び高値は用量との関連のない変化であり、偶発的な変動と考えられた。

6.4 器官重量 (Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-8)

雄では、20及び100 mg/kg 投与群において肝臓の絶対及び相対重量ともに対照群と比べ有意な高値を示し、100 mg/kg 投与群においては更に脾臓の絶対及び相対重量が有意な高値を示した。雌では、100 mg/kg 投与群において肝臓の相対重量が対照群と比べ有意な高値を示し、絶対重量は対照群を上回る傾向を示した。

6.5 剖検所見 (Table 5-1、5-2、Appendix 5-1~5-96)

雄では、精巣及び精巣上体の小型化が20 mg/kg 投与群の1例（動物番号：3009）に認められたが、その他には肉眼的な異常は認められなかった。雌では、肺の暗赤色巣が1例（動物番号：2106）に認められ、100 mg/kg 投与群の1例（動物番号：4106）に腎臓の表面粗造、脾臓の小型化、胃の陥凹巣、胸腺の小型化が認められた。その他、

妊娠 25 日の午前までに分娩が認められなかった 4 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：2101）に後肢の腫脹が認められた。なお、本例の子宮には受胎産物はみられず、着床痕のみ認められた。また、授乳 3 日までに全ての出生児が死亡した 4 mg/kg 群の 1 例（動物番号：2104）には腎臓の表面粗造並びに胃の陥凹巣がみられた。

6.6 病理組織学検査（Table 6-1~6-3、Appendix 5-1~5-96）

小葉中心性肝細胞肥大が 20 mg/kg 以上の投与群の雌雄にみられ、100 mg/kg 投与群の雄には脾臓に髓外造血の亢進及び褐色色素の沈着がみられた。その他、妊娠 25 日の午前までに分娩が認められなかった 4 mg/kg 群の 1 例（動物番号：2101）では、子宮の着床痕に膿瘍及び出血を伴う内膜炎、足根関節に関節炎がみられた他、子宮及び後肢の変化を反映して脾臓の髓外造血亢進及び肝臓に髓外造血がみられた。また、授乳 3 日までに全ての出生児が死亡した 4 mg/kg 群の 1 例（動物番号：2104）には腎臓に尿細管の変性／壊死、再生及び拡張並びに硝子円柱が、胃に前胃の潰瘍及び腺胃のびらん、肝臓に小葉中間帯の肝細胞空胞化、髓外造血、クッパー細胞の色素沈着及び肝細胞の萎縮が、脾臓に髓外造血の亢進が、子宮に内膜炎がみられた。

6.7 性周期（Table 7、Appendix 6-1~6-4）

各群の全例が 14 日間の観察期間中にほぼ 4~5 日周期の正常な発情回帰が認められ、発情回数及び性周期ともに対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.8 交配成績（Table 8、Appendix 7-1~7-4）

各群の雌雄全例において交尾が成立し、交尾した雌全例が妊娠し、交尾率、授精率及び受胎率とも 100%であり、交尾までに要した日数に対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.9 分娩成績（Table 9、Appendix 8-1~8-4）

4 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：2101）を除く各群の妊娠動物全例が正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率のいずれにも対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.10 出生児の性比及び外表観察（Table 10、Appendix 9-1~9-4）

出生児の生後 0 及び 4 日における性比には対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。外表異常を有する出生児は 20 mg/kg 投与群で狭窄尾が 1 例認められたが他の出生児には外表異常は認められず、自然発生異常と考えられた。

6.11 出生児の生存率（Table 11、Appendix 10-1~10-4）

4 mg/kg 投与群の 1 腹（動物番号：2104）は生後 3 日までに全ての出生児が死亡し、20 mg/kg 投与群の 1 腹（動物番号：3112）は出生児 19 匹の内 14 匹が死亡した。しか

し、これらを除く腹では生後 4 日生存率はほぼ 80%以上と良好であり、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

6.12 出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)

各用量群の雌雄とも出生日及び生後 4 日の体重に対照群と比べ有意な差は認められなかった。しかし、20 及び 100 mg/kg 投与群では出生日及び生後 4 日の体重が雌雄ともに対照群を下回る傾向を示し、当施設の背景データとの比較において下限値〔出生日：6.4 g (雄)、6.1 g (雌)、生後 4 日：9.6 g (雄)、9.2 g (雌)、2005～2010 年、16 試験〕と同程度あるいはそれを下回る値となった。

6.13 出生児の生後 4 日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)

各群とも出生児の体外表、胸部・腹部を含む器官・組織に肉眼的異常はみられなかった。

7. 考察

N-フェニル-1-ナフチルアミンを 0（対照群：オリブ油）、4、20 及び 100 mg/kg/day の用量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 4 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎及び分娩などの生殖発生に及ぼす影響を検討した。

7.1 雌雄動物に対する影響

20 及び 100 mg/kg 投与群の雌雄において暗紫色尿あるいは褐色尿がみられた。これら尿色の変化は 28 日間反復投与毒性試験²⁾においても認められており、尿中に排泄された被験物質あるいはその代謝物の色調に由来すると考えられている。その他、100 mg/kg 投与群の雌 1 例には授乳期間中のみの発現であったが、自発運動の低下がみられた。体重及び摂餌量に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。器官重量では、20 mg/kg 投与群の雄及び 100 mg/kg の雌雄において肝臓重量が高値を示し、100 mg/kg 投与群の雄では更に脾臓重量が高値を示した。病理組織学検査では 20 及び 100 mg/kg 投与群の雌雄において小葉中心性肝細胞肥大がみられ、肝臓重量の変動はこの組織変化を反映したものと考えられた。100 mg/kg 投与群の雄においては脾臓に髄外造血の亢進及び褐色色素の沈着がみられ、脾臓重量の変動はこの組織変化を反映したものと考えられ、*N*-フェニル-1-ナフチルアミンはラットに溶血性貧血を惹起する事が知られており²⁾脾臓組織にみられた変化はいずれも被験物質投与による溶血性貧血に反応した所見と考えられた。

7.2 生殖発生に対する影響

性周期及び雌雄動物の交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。これら交配成績に加え、雌雄内部生殖器に関する病理組織学検査では、被験物質投与に起因した変化は認められなかったことから、*N*-フェニル-1-ナフチルアミンの 100 mg/kg/day 投与は、精子形成及び排卵などの性腺機能、交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能に影響を及ぼさないと考えられた。

分娩及び哺育状態に関し、全ての着床胚が死亡し、分娩に至らなかった個体が 4 mg/kg 投与群で 1 例、全ての出生児あるいは出生児の多くが死亡した母動物が 4 及び 20 mg/kg 投与群で各 1 例みられたが、100 mg/kg 投与群の母動物においてこれらの異常は認められず、いずれも被験物質投与に関連しないと考えられた。出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数、出生率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。したがって、*N*-フェニル-1-ナフチルアミンの 100 mg/kg/day 投与は、妊娠維持、分娩及び哺育などの妊娠母体の機能に対して影響を及ぼさないと考えられた。

出生児に関し、性比並びに生後 4 日生存率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められず、出生児の外表及び剖検所見に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。しかし、雌雄出生児の出生日及び生後 4 日の体重ともに 20 mg/kg 以上の投与群において低値な傾向を示し、出生前あるいは出生後における発育に対する影響が示唆された。

これらの結果から、本試験条件下における *N*-フェニル-1-ナフチルアミンの雌雄動物及び出生児に対する無影響量及び無毒性量はともに 4 mg/kg/day と推察され、一方、交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能並びに母体機能としての妊娠の維持、分娩及び哺育に対して本被験物質の 100 mg/kg/day 投与は影響を及ぼさないと考えられた。

8. 文献

- 1) HPLC を用いた *N*-フェニル-1-ナフチルアミンの被験液中濃度測定法バリデーション（媒体：オリーブ油）、（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：A-2307、2010 年）
- 2) *N*-フェニル-1-ナフチルアミンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験、（財団法人 畜産生物化学安全研究所、試験番号：05-231、進行中）
- 3) *N*-フェニル-1-ナフチルアミンのラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（投与量設定試験）、（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：C-R143、2010 年）

R-1058

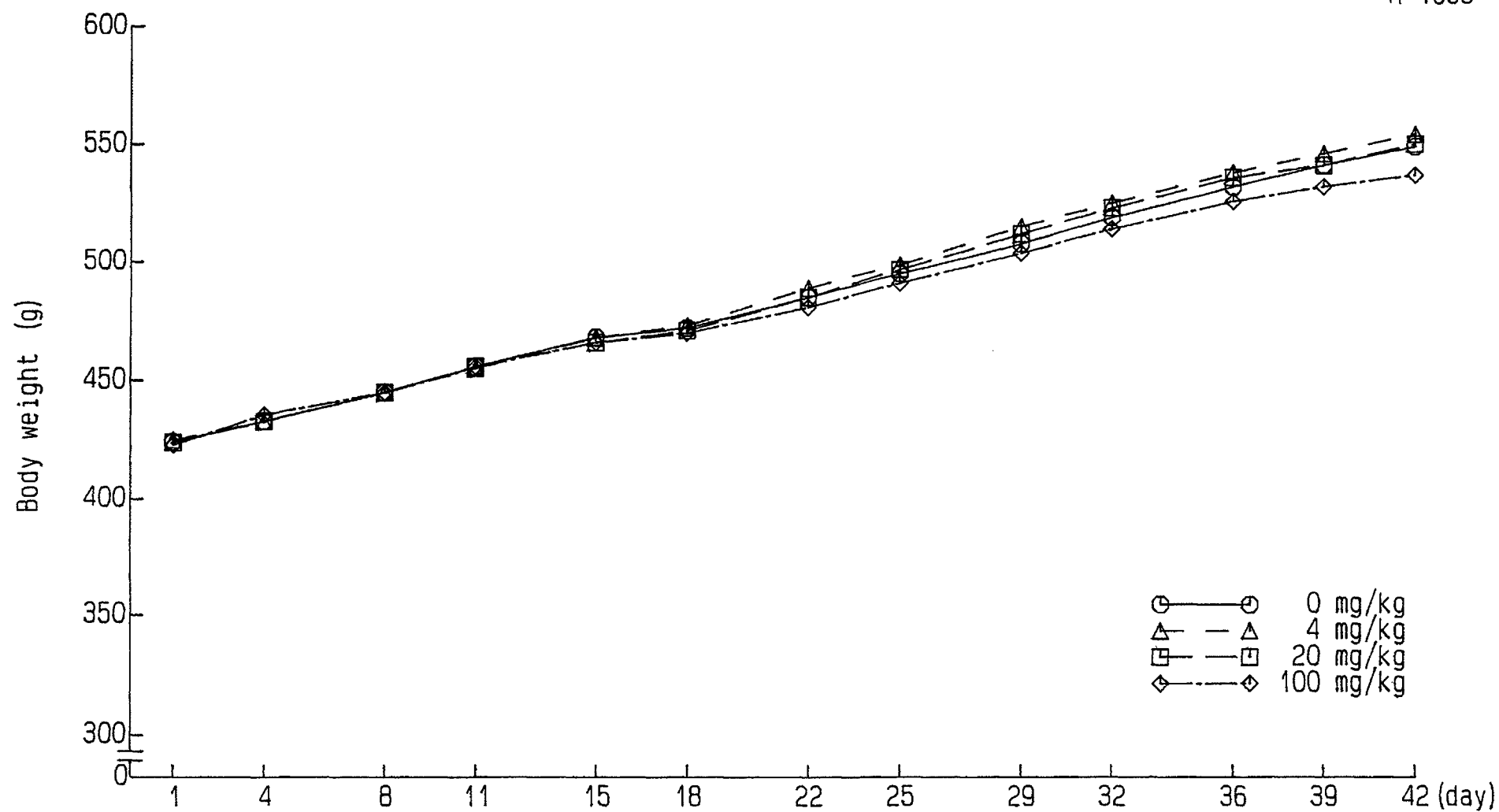


Fig.1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine
Body weight of male rats

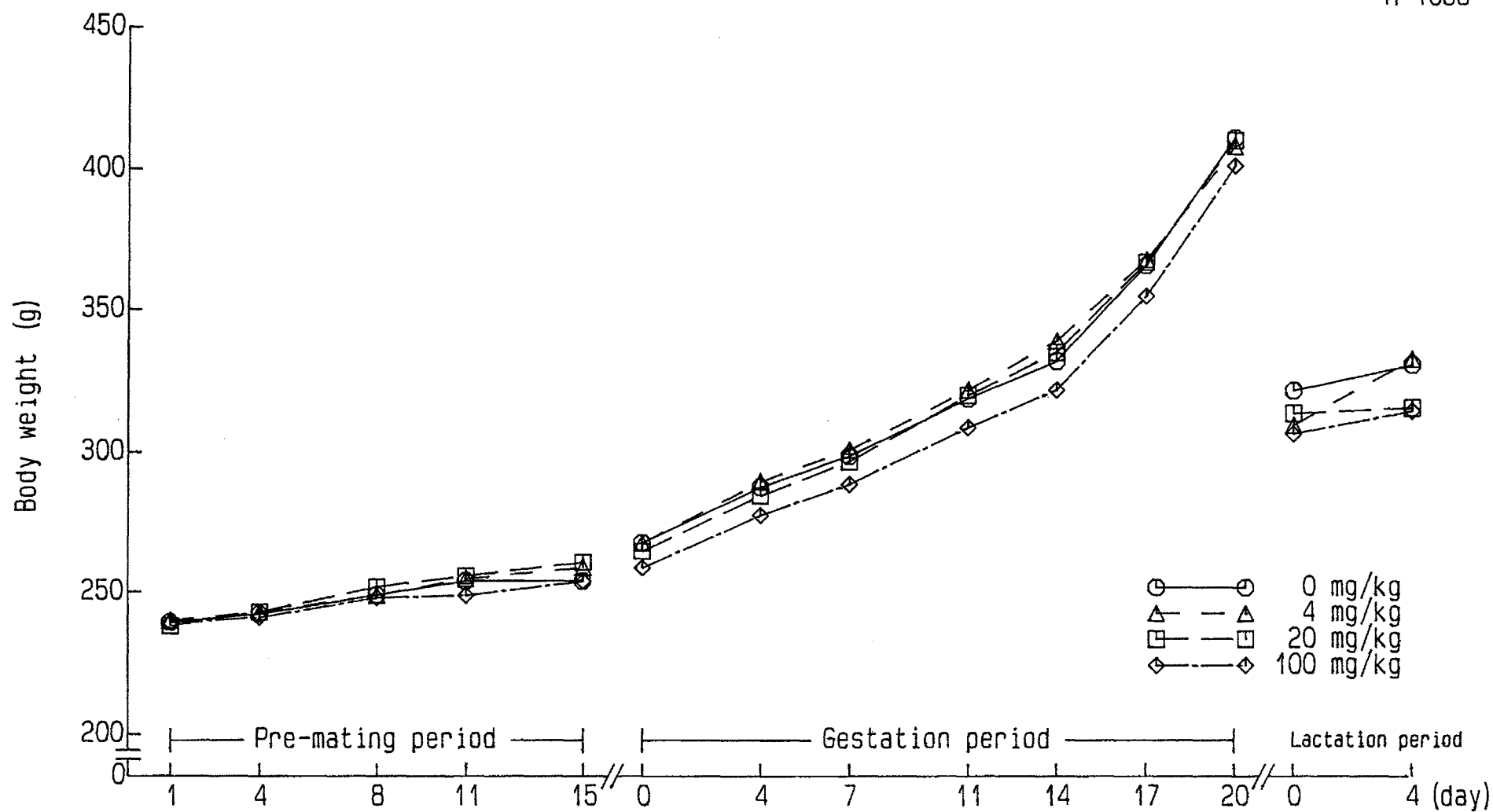


Fig.2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine

Body weight of female rats

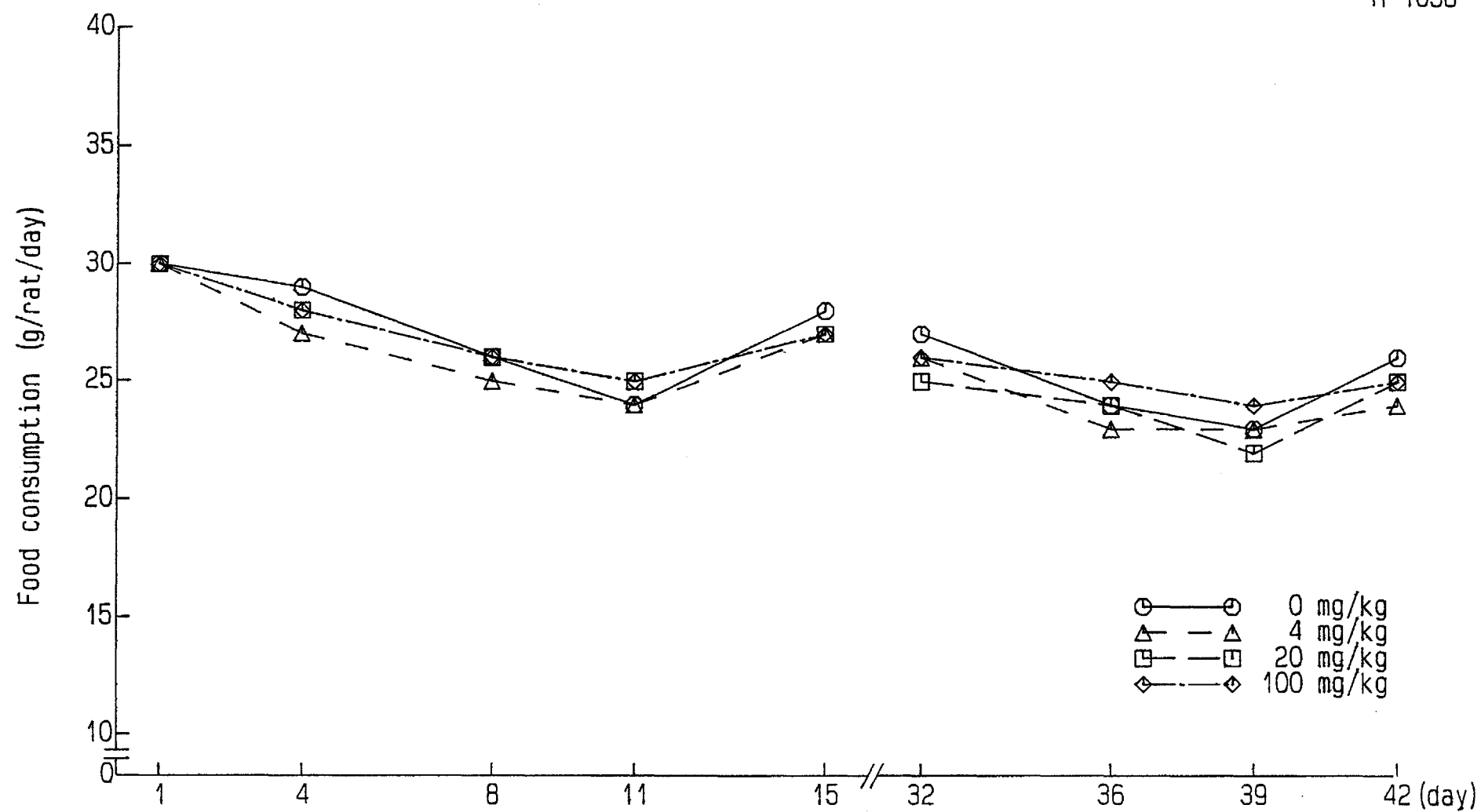


Fig.3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine

Food consumption of male rats

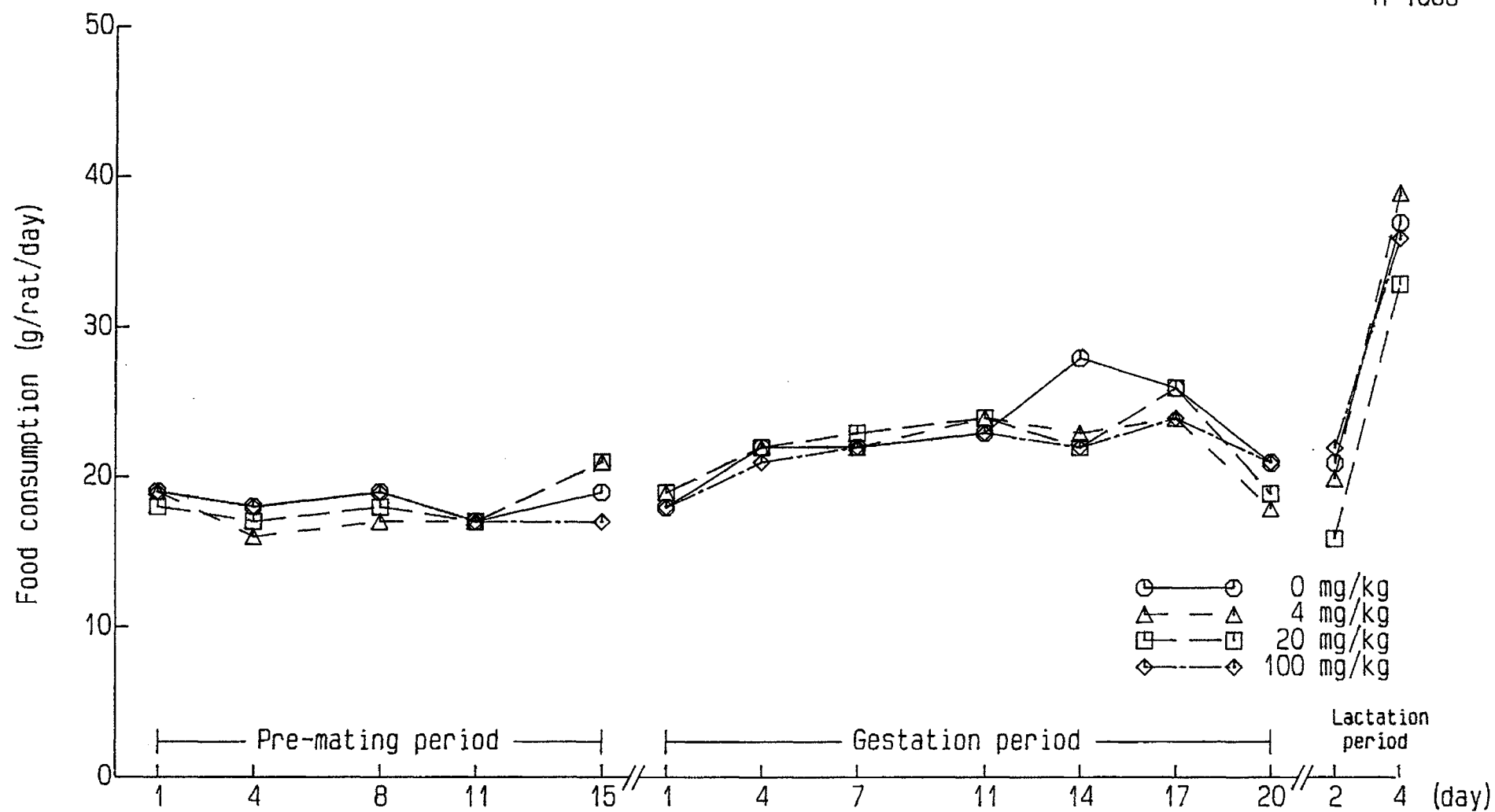


Fig.4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine

Food consumption of female rats

Table 1-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Clinical signs in male rats

Dose mg/kg	Signs	Day of administration						
		1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43a)
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
4	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
20	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	6	3	1	5	4	1
	Dark purple urine	0	0	0	0	3	0	0
	Brown urine	0	6	3	1	3	4	1
100	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	12	12	11	10	11	11	8
	Dark purple urine	12	12	10	6	8	8	1
	Brown urine	11	9	8	10	10	11	7

a): Day of necropsy

Table 1-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Clinical signs in female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	Signs	Day of administration														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	0	0
	Dark purple urine	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0
100	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	11	9	10	7	9	7	8	10	3	11	8	3	7	11
	Dark purple urine	0	10	0	5	1	4	1	5	5	0	4	8	1	4	6
	Brown urine	0	1	9	5	6	5	6	3	5	3	7	0	2	3	5

Table 1-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Clinical signs in dams during the gestation period

Dose mg/kg	Signs	Administration																									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	0		
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	1	1	1
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
	Smudge of perioral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	Swelling of hind limb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
20	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	0		
	No. of dams with abnormal findings	0	2	2	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0			
	Brown urine	0	2	2	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0			
100	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	0		
	No. of dams with abnormal findings	0	10	8	7	8	9	10	7	9	10	10	10	8	10	7	9	8	8	0	0	0	0	0			
	Dark purple urine	0	2	4	3	4	4	3	3	3	3	4	3	4	5	3	6	6	5	0	0	0	0	0			
	Brown urine	0	8	4	4	4	5	7	4	6	7	6	7	4	5	4	3	2	3	0	0	0	0	0			

a): Gestation day

Table 1-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Clinical signs in dams during the lactation period

Dose mg/kg	Signs	Administration					5a)
		0	1	2	3	4	
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
4	No. of dams	11	11	11	11	10 ^{b)}	10
	No. of dams with abnormal findings	0	1	1	0	0	0
	Decrease in nursing behavior	0	1	1	0	0	0
20	No. of dams	12	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	1	0	0	0	0
	Decrease in nursing behavior	0	1	0	0	0	0
100	No. of dams	12	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	1	1
	Decrease in spontaneous movement	0	0	0	0	1	1

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 3 because all pups died.

Table 2-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine

Body weight of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Mating period				Post-mating period				Gain 1-42
		1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	42a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	424	433	445	456	468	472	485	495	508	519	532	541	549	125
	S.D.	16	19	18	21	23	26	27	24	28	27	26	27	27	15
4	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	425	433	445	455	468	473	489	499	515	525	538	546	554	130
	S.D.	22	22	22	25	28	27	27	28	29	31	30	32	34	28
20	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	424	433	445	456	466	471	485	497	512	523	536	541	550	126
	S.D.	19	20	23	25	28	30	31	33	34	34	37	37	39	26
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	423	436	445	456	466	470	481	491	504	514	526	532	537	115
	S.D.	19	21	21	25	25	26	30	29	32	32	34	33	34	22

Unit: g

No.: No. of animals

a): Day of administration

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Body weight of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration					Gain 1-15
		1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	239	242	249	254	254	16
	S.D.	10	11	11	9	11	6
4	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	240	243	249	255	259	20
	S.D.	14	13	14	14	16	4
20	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	238	243	252	256	261	23*
	S.D.	11	13	14	12	13	8D
100	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	239	241	248	249	254	15
	S.D.	11	11	12	12	13	8

Unit: g

No.: No. of animals

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

D: Dunnett's test

Table 2-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Body weight of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration							Gain 0-20
		0	4	7	11	14	17	20a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	268	288	299	319	332	366	411	143
	S.D.	18	18	18	18	22	20	20	12
4	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	268	290	301	322	339	368	408	140
	S.D.	17	17	20	18	21	21	20	20
20	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	265	285	297	320	335	367	410	146
	S.D.	15	17	16	21	21	22	24	14
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	259	278	289	309	322	355	401	142
	S.D.	16	16	17	16	17	21	21	16

Unit: g

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Body weight of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration		Gain 0-4
		0	4a)	
0	No.	12	12	12
	Mean	322	331	9
	S.D.	27	22	15
4	No.	11	10 ^{b)}	10
	Mean	310	333	18
	S.D.	23	17	8
20	No.	12	12	12
	Mean	314	316	2
	S.D.	31	29	26
100	No.	12	12	12
	Mean	307	315	8
	S.D.	24	34	22

Unit: g

No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 3 because all pups died.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine
Food consumption of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Post-mating period			
		1	4	8	11	15	32	36	39	42a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	30	29	26	24	28	27	24	23	26
	S.D.	3	3	2	2	2	2	3	2	2
4	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	30	27	25	24	27	26	23	23	24
	S.D.	4	2	3	3	3	2	2	2	2
20	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	30	28	26	25	27	25	24	22	25
	S.D.	2	3	2	3	1	2	2	2	2
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	30	28	26	25	27	26	25	24	25
	S.D.	2	3	2	3	2	3	2	3	1

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

a): Day of administration

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Food consumption of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration				
		1	4	8	11	15
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	19	18	19	17	19
	S.D.	4	3	3	2	2
4	No.	12	12	12	12	12
	Mean	19	16	17*	17	21
	S.D.	3	3	2D	2	5
20	No.	12	12	12	12	12
	Mean	18	17	18	17	21*
	S.D.	3	2	2	2	1DT
100	No.	12	12	12	12	12
	Mean	19	18	19	17	17
	S.D.	2	2	1	3	3

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

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

D: Dunnett's test

DT: Dunnett-type rank test

Table 3-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Food consumption of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration						
		1	4	7	11	14	17	20a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	18	22	22	23	28	26	21
	S.D.	3	2	2	4	16	3	4
4	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	19	22	22	24	23	24	18
	S.D.	3	3	4	4	2	2	6
20	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	19	22	23	24	22	26	19
	S.D.	3	2	2	4	3	2	3
100	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	18	21	22	23	22	24	21
	S.D.	3	2	2	2	2	6	3

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine
Food consumption of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration	
		2	4a)
0	No.	12	12
	Mean	21	37
	S.D.	4	7
4	No.	11	10 ^{b)}
	Mean	20	39
	S.D.	8	4
20	No.	12	12
	Mean	16	33
	S.D.	9	12
100	No.	12	12
	Mean	22	36
	S.D.	8	12

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 3 because all pups died.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 4-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine

Organ weight of male rats

		Dose mg/kg	Body weight g	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Testes (R+L) g(g/100g BW)	Epididymides (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	12	12	12	12	12
		Mean	548	18.38	0.81	3.36	1275
		S.D.	28	1.32	0.09	0.35	79
	4	No.	12	12	12	12	12
		Mean	556	19.53	0.86	3.43	1313
		S.D.	35	1.51	0.10	0.23	85
	20	No.	12	12	12	12	12
		Mean	552	20.58*	0.87	3.38	1289
		S.D.	38	3.09D	0.12	0.37	157
	100	No.	12	12	12	12	12
		Mean	540	22.97**	0.94**	3.45	1277
		S.D.	36	2.28D	0.10D	0.32	91
Relative	0	No.		12	12	12	12
		Mean		3.35	0.15	0.61	233
		S.D.		0.17	0.02	0.07	17
	4	No.		12	12	12	12
		Mean		3.51	0.15	0.62	237
		S.D.		0.18	0.02	0.06	20
	20	No.		12	12	12	12
		Mean		3.72**	0.16	0.62	235
		S.D.		0.38D	0.02	0.08	34
	100	No.		12	12	12	12
		Mean		4.25**	0.18**	0.64	237
		S.D.		0.25D	0.02D	0.06	22

*: p<0.05; **: p<0.01 (Significant difference from control group)
D: Dunnett's test

Table 4-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine

Organ weight of female rats

		Dose mg/kg	Body weight g	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)
Absolute	0	No.	12	12	12
		Mean	344	14.76	0.73
		S.D.	22	1.68	0.08
	4	No.	10	10	10
		Mean	339	13.99	0.68
		S.D.	19	1.57	0.05
	20	No.	12	12	12
		Mean	329	15.19	0.67
		S.D.	25	1.89	0.10
	100	No.	12	12	12
		Mean	325	16.54	0.69
		S.D.	37	1.99	0.16
Relative	0	No.		12	12
		Mean		4.30	0.21
		S.D.		0.40	0.02
	4	No.		10	10
		Mean		4.13	0.20
		S.D.		0.35	0.02
	20	No.		12	12
		Mean		4.61	0.20
		S.D.		0.46	0.03
	100	No.		12	12
		Mean		5.10**	0.21
		S.D.		0.38D	0.04

** : p<0.01 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 5-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Gross pathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 12	4 12	20 12	100 12
Epididymis					
Small		0	0	1	0
Testis					
Small		0	0	1	0

M : Male

Table 5-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Gross pathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 12	F 4 12	F 20 12	F 100 12
Findings					
Hindlimb					
Swelling		0	1	0	0
Kidney					
Irregular surface		0	1	0	1
Lung(bronchus)					
Focus, dark red		0	1	0	0
Spleen					
Small		0	0	0	1
Stomach					
Focus, depressed		0	1	0	1
Thymus					
Small		0	0	0	1

F : Female

Table 6-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Histopathological findings

Organs	Sex: Dose (mg/kg): Number:	M 0 12	M 4 12	M 20 12	M 100 12
Findings					
Epididymis					
Number examined		12	0	1	12
Not remarkable		11	0	0	12
Granuloma, spermatic		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Hypospermia		0	0	1	0
severe		0	0	1	0
Cell debris, lumen		0	0	1	0
mild		0	0	1	0
Liver					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		8	7	4	0
Vacuolation, hepatocyte, midzonal		1	2	5	1
minimal		0	2	5	1
mild		1	0	0	0
Vacuolation, hepatocyte, periportal		3	2	2	0
minimal		3	2	1	0
mild		0	0	1	0
Necrosis, focal		0	0	1	0
minimal		0	0	1	0
Microgranuloma		0	1	0	1
minimal		0	1	0	1
Hypertrophy, hepatocytic, central		0	0	4	12
minimal		0	0	4	4
mild		0	0	0	8
Prostate					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		7	0	0	5
Atrophy, acinar, focal		0	0	0	1
minimal		0	0	0	1
Cell infiltration, interstitial		5	0	0	6
minimal		4	0	0	4
mild		1	0	0	2
Seminal vesicle					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		12	0	0	12
Spleen					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		12	12	12	3
Hematopoiesis, extramedullary, increased		0	0	0	6
minimal		0	0	0	6
Brown pigment, increased		0	0	0	4
minimal		0	0	0	4
Testis					
Number examined		12	0	1	12
Not remarkable		12	0	0	11
Atrophy, seminiferous tubular		0	0	1	1
minimal		0	0	0	1
moderate		0	0	1	0

M : Male

Table 6-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine
Histopathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 12	F 4 12	F 20 12	F 100 12
Findings					
Hindlimb					
Number examined		0	1	0	0
Arthritis		0	1	0	0
severe		0	1	0	0
Kidney					
Number examined		0	1	0	1
Dilatation,tubular		0	1	0	1
mild		0	1	0	1
Degeneration/necrosis,tubular		0	1	0	1
mild		0	1	0	0
moderate		0	0	0	1
Regeneration,tubular		0	1	0	1
mild		0	1	0	1
Urinary cast,hyaline		0	1	0	1
minimal		0	1	0	0
mild		0	0	0	1
Liver					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		12	10	10	2
Vacuolation,hepatocyte,midzonal		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Vacuolation,hepatocyte,periportal		0	0	1	0
mild		0	0	1	0
Hematopoiesis,extramedullary		0	2	0	0
mild		0	2	0	0
Pigmentation,Kupffer cell		0	1	0	1
minimal		0	1	0	1
Atrophy,hepatocytic		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Hypertrophy,hepatocytic,central		0	0	1	10
minimal		0	0	1	8
mild		0	0	0	2
Lung(bronchus)					
Number examined		0	1	0	0
Not remarkable		0	1	0	0
Ovary					
Number examined		12	2	0	12
Not remarkable		12	2	0	12
Spleen					
Number examined		12	2	0	12
Not remarkable		11	0	0	11
Atrophy		0	0	0	1
moderate		0	0	0	1
Necrosis,focal		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Hematopoiesis,extramedullary,increased		0	2	0	0
mild		0	2	0	0
Stomach					
Number examined		0	1	0	1
Erosion,glandular stomach		0	1	0	1
minimal		0	0	0	1
mild		0	1	0	0
Ulcer,forestomach		0	1	0	1
mild		0	1	0	1

F : Female

Table 6-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Histopathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 12	F 4 12	F 20 12	F 100 12
Findings					
Thymus					
Number examined		0	0	0	1
Atrophy		0	0	0	1
severe		0	0	0	1
Uterus					
Number examined		12	2	0	12
Not remarkable		12	0	0	11
Abscess		0	1	0	0
moderate		0	1	0	0
Endometritis		0	2	0	1
minimal		0	1	0	1
mild		0	1	0	0
Vagina					
Number examined		12	2	0	12
Not remarkable		12	2	0	12

F : Female

Table 7

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Estrous cycle in female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus					Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4	
0	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5
4	12	0	0	1	10	1	3.0±0.4
20	12	0	0	0	10	2	3.2±0.4
100	12	0	0	1	6	5	3.3±0.7

No significant difference in any treated groups from control group

Table 8 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine

Mating and fertility of animals

Dose mg/kg	Male				Female			
	No. of males	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Insemination index (%) b)	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) c)
0	12	4.0±3.7	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	4.0±3.7	12/12(100.0)	12/12(100.0)
4	12	2.8±3.6	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.8±3.6	12/12(100.0)	12/12(100.0)
20	12	2.3±1.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.3±1.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)
100	12	2.8±1.4	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.8±1.4	12/12(100.0)	12/12(100.0)

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

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

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

No significant difference in any treated groups from control group

Table 9 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine

Delivery data on dams

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females with liveborns	Delivery index % a)	Gestation length in days	No. of corpora lutea	No. of implan- tation sites	Implan- tation index % b)	No. of stillborns (%)c)	No. of liveborns	Live birth index % d)
0	Total	12	12	100.0		188	184		1	168	
	Mean				21.8	15.7	15.3	97.9	(0.6)	14.0	91.2
	S.D.				0.4	1.5	1.6	3.1	(1.9)	1.9	6.9
4	Total	12	11	91.7		169	165		6	150	
	Mean				22.0	15.4	15.0	97.6	(3.4)	13.6	91.3
	S.D.				0.0	1.4	1.5	3.3	(7.2)	1.2	7.0
20	Total	12	12	100.0		190	189		4	172	
	Mean				22.1	15.8	15.8	99.4	(2.1)	14.3	90.9
	S.D.				0.3	2.2	2.2	1.9	(4.0)	2.5	7.3
100	Total	12	12	100.0		189	184		4	175	
	Mean				21.8	15.8	15.3	97.5	(2.2)	14.6	95.1
	S.D.				0.4	1.1	1.0	4.0	(5.9)	1.4	6.4

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

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

c): (No. of stillborns / No. of liveborns and stillborns) × 100

d): (No. of liveborns / No. of implantation sites) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 10

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine

Sex ratio and external examination of pups

Dose mg/kg	No. of dams		Liveborns		Sex ratio of liveborns at birth a)	Day 4		Sex ratio of live pups on day 4 b)	External c) abnor- malities (%)d)
			No. of males	No. of females		No. of males	No. of females		
0	12	Total	80	88		80	86		0
		Mean	6.7	7.3	0.47	6.7	7.2	0.48	(0.0)
		S.D.	2.0	1.3	0.10	2.0	1.2	0.10	(0.0)
4	11	Total	69	81		63	71		0
		Mean	6.3	7.4	0.46	6.3	7.1	0.48	(0.0)
		S.D.	1.4	1.9	0.12	0.9	1.8	0.09	(0.0)
20	12	Total	83	89		67	82		1e)
		Mean	6.9	7.4	0.48	5.6	6.8	0.46	(0.6)
		S.D.	2.6	2.4	0.15	2.2	2.7	0.14	(2.0)
100	12	Total	84	91		79	91		0
		Mean	7.0	7.6	0.48	6.6	7.6	0.46	(0.0)
		S.D.	1.9	1.8	0.12	2.0	1.8	0.12	(0.0)

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

b): No. of live males on day 4 / No. of live pups on day 4

c): No. of liveborns with external abnormalities

d): (No. of liveborns with external abnormalities / No. of liveborns) × 100

e): Narrowed tail

No significant difference in any treated groups from control group

Table 11 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with N-Phenyl-1-naphthylamine

Viability index of pups

Dose mg/kg		No. of dams	No. of live pups		Viability index on postnatal day 4 % a)
			Day 0	Day 4	
0	Total	12	168	166	
	Mean		14.0	13.8	98.9
	S.D.		1.9	1.7	2.5
4	Total	11	150	134	
	Mean		13.6	12.2	88.8
	S.D.		1.2	4.4	30.3
20	Total	12	171 ^{b)}	149	
	Mean		14.3	12.4	89.2
	S.D.		2.5	3.1	21.2
100	Total	12	175	170	
	Mean		14.6	14.2	97.0
	S.D.		1.4	1.8	4.8

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

b): One pup with external abnormalities was excluded.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 12

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine

Body weight of pups

Dose mg/kg		Male			Female		
		0	4a)	Gain	0	4a)	Gain
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	6.5	9.8	3.3	6.1	9.2	3.1
	S.D.	0.3	0.9	0.8	0.3	0.8	0.6
4	No.	11	10 ^{b)}	10	11	10 ^{b)}	10
	Mean	6.5	10.3	3.7	6.2	9.6	3.3
	S.D.	0.6	1.1	0.6	0.6	0.8	0.4
20	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	6.4	9.0	2.7	6.0	8.7	2.7
	S.D.	0.7	1.6	1.2	0.5	1.4	1.1
100	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	6.1	8.8	2.7	5.8	8.4	2.6
	S.D.	0.4	1.4	1.4	0.4	1.4	1.3

Unit: g

No.: No. of dams

a): Postnatal day

b): All pups in one dam died.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 13 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with N-Phenyl-1-naphthylamine
Gross pathological findings in pups on postnatal day 4

	Dose (mg/kg)	0	4	20	100
Male					
No. of pups examined		80	63	67	79
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0
Female					
No. of pups examined		86	71	82	91
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0