最 終 報 告 書

4-ニトロ-o-アニシジンのラットを用いる簡易生殖毒性試験

（試験番号：04-213-2）

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要 約 ………………………………………………………… 1頁

はじめに ……………………………………………………… 2

目 的 ………………………………………………………… 2

材料および方法 ………………………………………………… 2

1．被験物質 ………………………………………………… 2

2．供試動物および飼育条件 ………………………………… 2

3．投与量の設定，試験群の構成および投与方法 ………… 3

4．観察および検査 ………………………………………… 4

1）親動物に関する項目 ………………………………… 4

(1) 一般状態観察 ………………………………………… 4

(2) 体重および摂餌量測定 ……………………………… 4

(3) 性周期検査 …………………………………………… 5

(4) 交配および分娩状態観察 …………………………… 5

(5) 剖検および器官重量測定 …………………………… 5

(6) 病理組織学検査 ……………………………………… 5

2）出産児の観察 ………………………………………… 6

(1) 産児数，性比および外表観察 ……………………… 6

(2) 一般状態観察 ………………………………………… 6

(3) 体重測定 ……………………………………………… 6

(4) 病理学検査 …………………………………………… 6

5．統計解析 ………………………………………………… 6

結 果 ………………………………………………………… 8

1．反復投与毒性 …………………………………………… 8

1）一般状態および死亡 ………………………………… 8

2）体重 …………………………………………………… 8

3）摂餌量 ………………………………………………… 8

4）剖検 …………………………………………………… 8

5）器官重量 ……………………………………………… 9

6）病理組織学検査 ………………………………………………… 9
（1）生殖器系以外の器官 ……………………………………… 9
（2）生殖器系器官 ………………………………………………… 9
2．生殖発生毒性 …………………………………………………… 9
1）親動物に及ぼす影響 ………………………………………… 9
（1）性周期検査 …………………………………………………… 9
（2）交尾率および受胎率 ……………………………………… 10
（3）黄体数，着床数および着床率 ………………………… 10
（4）出産率および妊娠期間 …………………………………… 10
（5）分娩および哺育状態 ……………………………………… 10
2）新生児に及ぼす影響 ………………………………………… 10
（1）生存性および体重 ………………………………………… 10
（2）形態 …………………………………………………………… 10
考　察 ………………………………………………………………… 12
文　献 ………………………………………………………………… 13
添付資料
A　図・群別平均値表
Figures　1，2　体重 ……………………………………………… 1
Figures　3，4　摂餌量 …………………………………………… 3
Tables　1，2　死亡率 …………………………………………… 5
Tables　3，4　一般状態 ………………………………………… 7
Tables　5，6　体重 ……………………………………………… 9
Tables　7，8　摂餌量 …………………………………………… 11
Tables　9，10　剖検 ……………………………………………… 13
Tables　11，12　器官重量 ……………………………………… 15
Tables　13〜15　病理組織学検査所見 ………………………… 17
Table　16　生殖に及ぼす影響 …………………………………… 20
Table　17　新生児に及ぼす影響 ………………………………… 21
Table　18　新生児の外表所見 …………………………………… 22
Table　19　新生児の内臓所見 …………………………………… 23

要　約

化学産業の分野において洗顔料として使用されている4-ニトロ-o-アニシジンについて、ラットを用い0、8、40および200 mg/kg/day用量で簡易生殖毒性試験を実施した。動物は1群雌雄各12匹とし、被験物質は交配開始14日前から雄は47日間、雌は分娩後哺育4日（42～55日）まで投与した。

1．反復投与毒性

40 mg/kg以上の群の雌雄で、投与開始初期に自発運動低下および眼瞼下垂が認められた。さらに、200 mg/kg群では、雌雄に体重増加の抑制および摂餌量の減少傾向並びに雌1匹の死亡が認められた。また、200 mg/kg群で雌雄に肝臓相対重量、雄に脾臓相対重量、雌に脾臓絶対および相対重量のいずれも高値が認められ、雌雄の脾臓は肉眼的に黒色化する例も認められた。病理組織学検査では、雌雄の脾臓に髄外造血亢進および褐色色素沈着増加が、また、雄に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大例が認められた。

以上の結果から、4-ニトロ-o-アニシジンのラットへの反復投与により、主に脾臓、肝臓および腎臓に対する毒性影響が認められ、無影響量は8 mg/kg/dayと結論された。

2．生殖発生毒性

親動物の性周期、交尾率、受胎率、黄体数、着床数、着床率、出産率並びに分娩および哺育状態に変化は認められなかった。

児動物の発生に対しては、200mg/kg群で新生児体重の有意な低値が認められた。総出産児数、分娩率、新生児数、出生率、性比、生存率、体重および形態に変化は認められなかった。

以上の結果より、雌雄親動物の生殖能に対する無影響量は200 mg/kg/day、児動物の発生に対する無影響量は40 mg/kg/dayと結論された。

はじめに

4-ニトロ-o-アニシジンは、化学産業の分野において洗顔料として使用されている化学物質である。本物質の毒性について、ラット経口投与における LD_{50} 値は 1000mg/kg で、皮膚、眼および粘膜に対して刺激性を有する[1]ことが知られている。また、ラットへの 28 日間反復経口投与により、脾臓、肝臓、尿および血液等に対する毒性影響が認められている[2]。生殖発生毒性については、検討した報告はみられない。本試験は、OECD の高生産量既存化学物質安全点検事業の一環として実施したものである。

目　的

4-ニトロ-o-アニシジンをラットに反復経口投与し、本物質の生殖毒性について検討した。

材料および方法

1．被験物質

被験物質の 4-ニトロ-o-アニシジン（CAS No．97-52-9）は、分子量 168.15、融点 140.9℃の非水溶性の明るい黄色微細な針状結晶で、試験には
から購入したロット番号　　　（純度 99.9%）を冷暗条件下（2～6℃）で保管し、使用した。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。投与液は、コーン油（ナカライテスク株式会社、ロット番号 V4N3566、V4G2385）を用いて、所定の投与用量となる濃度の懸濁液に調製した。本物質の 20 および 0.1% 液について安定性試験を実施した結果、投与液中の被験物質は均一、かつ、冷暗条件下（4℃）で少なくとも 8 日間は安定であることが確認された（Appendix 2）。したがって、投与液の使用期間は調製後 8 日間とし、調製した投与液は 1 日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所（2～6℃）遮光下で密栓して保管した。また、初回に調製した投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した（Appendix 3）。

2．供試動物および飼育条件（Appendix 4～6）

8 週齢の SD 系[Crj：CD（SD）IGS]の SPF ラットを日本チャールス・リバー株式会社 厚木生産場（神奈川県厚木市下古沢 795 番地）から搬入（雌雄各 55 匹）し、

13日間試験環境に馴化させ、その間に臨床観察および3回の体重測定による検疫並びに雌については膣垢法による10日間の性周期観察も合わせて行い、発育が順調で、一般状態および雌の性周期に異常の認められなかった雌雄各48匹を10週齢で試験に用いた。1群の動物数は雌雄各12匹とし、群分けは投与開始前日の体重に基づく層化無作為抽出法を用いて行った。投与開始時の平均体重（体重範囲）は、雄380（355～441）g、雌238（219～260）gであった。

ラットは、温度22±3℃、湿度55±10%、換気回数10回以上／時（オールフレッシュエアー方式）、照明12時間／日（午前7時点灯、午後7時消灯）に設定されたバリアーシステム動物室（第2室）で、個体別にステンレス製金網ケージ［260W×380D×180H（mm）］に収容し、これをステンレス製5段のラックに設置して飼育した。ただし、交配の成立した雌は、巣作り材料（ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社、ロット番号 16．10．28）を入れたポリカーボネート製ケージ［265W×426D×180H（mm）］に収容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料（日本農産工業株式会社、固型飼料ラボMRストック、ロット番号041158-2、041278）並びに飲料水（孔径1μmのカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水）は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶（ポリカーボネートケージの場合）により自由に摂取させた。動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札貼付並びに耳パンチ法により行った。

なお、動物の飼育期間を通じて、動物室の温度は22.0～23.5℃、湿度は48～58%の範囲で推移し（温度・湿度の測定結果：Appendix 4）、また飼料中の汚染物質の分析結果（Appendix 5）、飲料水の水質検査の結果（Appendix 6）および巣作り材料中汚染物質の分析結果（Appendix 7）は、いずれも当研究所が設定した許容範囲内の値であった。したがって動物の飼育期間中において試験成績の信頼性に影響を及ぼすと考えられる環境要因の変化は、なかったものと判断された。

また、本試験は、動物実験を科学的観点および倫理的な配慮の下に実施するために遵守すべき事項等を定めた、「財団法人　畜産生物科学安全研究所の動物実験実施規定」に従って行った。

3．投与量の設定、試験群の構成および投与方法

10週齢のラットを一群雌雄各4匹用い、0、100、200、400および600 mg/kg/day

で 14 日間反復経口投与した結果、100mg/kg 以上の群の雌雄で自発運動の低下や腹臥姿勢が、さらに雄では体重増加の抑制傾向、雌では脾臓重量の高値が認められた。また、雄の脾臓重量の高値が 200 mg/kg 以上の群で認められたほか、400 mg/kg 以上の群では雌雄に脾臓、肝臓および腎臓の黒色化あるいは暗色調化並びに死亡が認められた。

以上のことから、本試験における投与量については、確実に毒性影響が発現すると予測される 200 mg/kg/day を最高用量、毒性影響が発現しないと予測される 8 mg/kg/day を最低用量とし、これらの用量の間に 40 mg/kg/day の計 3 用量を設定した。

試験群の構成は、(1) 溶媒投与群(以下、対照群)、(2) 被験物質の 8 mg/kg/day 投与群(8 mg/kg 群)、(3) 同 40 mg/kg/day 投与群(40 mg/kg 群)、(4) 同 200 mg/kg/day 投与群(200 mg/kg 群)の 4 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には溶媒として用いたコーン油を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始 14 日前から、雄は 47 日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育 4 日まで、最短 42 日～最長 55 日間、1 日 1 回、午前中(9：00～12：00)に投与した。

4．観察および検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、朝夕の少なくとも 2 回は、動物の生死、外観、行動等について観察した。特に、妊娠、出産、哺育の状態については、注意深く観察した。

(2) 体重および摂餌量測定

体重は、雄については投与 1(投与開始日)、8、15、22、29、36、43 および 47 日、雌は投与 1、8 および 15 日、妊娠 0、7、14 および 20 日、哺育 0 および 4 日に測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて、ケージごとに翌日までの 24 時間飼料消費量を測定した。ただし、摂餌量の最終測定日は、雄では投与 46 日、雌では哺育 3 日とした。交配期間中の投与 15 日には雌雄の全例、投与 22 日には交

尾が成立していない雌雄の摂餌量は測定しなかった。

(3) 性周期検査

雌について、馴化・検疫期間に引き続き、交尾が確認されるまで、Giemsa 染色による膣垢塗抹標本を作製し、鏡検により性周期段階の判定を行った。

(4) 交配および分娩状態観察

交配前 2 週間の投与を終了（投与 15 日の午後）した雌雄を同一群内で 1 対 1 の組み合わせを作り、2 週間を限度として交尾が確認されるまで連続同居させた。交配期間中は毎朝一定時刻（9：30 頃）に交尾の確認を行い、交尾率（%）[（交尾動物数／同居動物数）×100]を算出した。交尾は膣栓形成あるいは膣垢中の精子の有無により確認し、確認された日を妊娠 0 日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について、受胎率（%）[（受胎雌数／交尾成立雌数）×100]および出産率（%）[（生児出産雌数／妊娠雌数）×100] を算出した。

(5) 剖検および器官重量測定

雄は投与47日の翌日、雌については、分娩し哺育も順調であった例は哺育5日、哺育 4 日までに全児死亡が認められた対照群の 1 例（動物番号 501）は哺育 4 日に、それぞれエーテル麻酔下で放血屠殺し、体表、開口部粘膜および内部諸器官を肉眼的に観察した。また、雌雄の脾臓、腎臓、肝臓および雄の精巣および精巣上体を秤量（絶対重量）し、屠殺日の体重に基づいて対体重比（相対重量）を算出した。雌については、卵巣の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率（%）[（着床痕数／黄体数）×100] を算定した。なお、200mg/kg 群で 1 例（動物番号 537)、分娩の翌朝に死亡が確認され、剖検した。

(6) 病理組織学検査

全例について、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮およびその他肉眼的異常部位を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液（精巣、精巣上体はブアン液で前固定）で固定し、保存した。

病理組織学検査は、対照群と最高用量群の全動物について、精巣、精巣上体および卵巣並びに剖検および器官重量において被験物質の投与による変化が認められた器官について行った。その他の群については、雌雄各 5 匹について、最高用量群で変化の認められた器官について実施した。肉眼的異常部位については、全ての群の全ての例について検査した。検査は常法に従ってパラフィン切片を作製

し、H-E 染色を施して鏡検した。また、精巣については、精子形成サイクル検査（ステージII・III、V、VIIおよびXII）のため、PAS 染色も行った。

2）出産児の観察

（1）産児数、性比および外表観察

分娩完了の確認後、各腹の産児数（生産児と死亡児の合計）を調べ、分娩率（%）[（総出産児数／着床数）×100] を、また肛門と生殖突起の距離の長短により雌雄を判別し、群ごとの性比を算出した。また、新生児について、口腔内を含む外表の異常を調べた。

（2）一般状態観察

毎日、一般状態および生死を確認し、出生率（%）[（出産確認時生児数／総出産児数）×100]および新生児生存率（%）[（哺育 4 日の生児数／出産確認時生児数）×100] を算出した。

（3）体重測定

新生児について、哺育 0 および 4 日に、雌雄別に各腹の体重を測定し、1 匹当たりの平均体重を算出した。

（4）病理学検査

死亡例はその都度、生存例は哺育 4 日にエーテル麻酔下で放血死させ、胸部および腹部における主要器官について肉眼的に観察した。

5．統計解析

得られた平均値あるいは頻度について、被験物質投与各群と対照群との間の有意差（危険率 5%以下）を、次の方法で検定した。すなわちパラメトリックデータ（体重、摂餌量、器官重量、黄体数、着床数、交尾成立期間、妊娠期間、産児数、死亡児数等）は、Bartlett の分散検定を行った。その結果、分散が一様な場合は一元配置の分散分析を行い、有意差を認めた場合は Dunnett 法により対照群との比較検定を行った。分散が一様でない場合およびノンパラメトリックデータ（性周期、着床率、出生率、分娩率、新生児生存率、出産児の外表および内臓検査における発現率等）は Kruskal - Wallis の順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合は Dunnett 型の検定を行った。2 群間の比較（精子形成サイクル検査データ）については、F 検定

を行い、その結果分散が一様な場合はStudentのt検定を、分散が一様でない場合はAspin-Welchのt検定を行った。カテゴリカルデータには、Fisherの直接確率法（一般状態の観察、剖検、病理組織学検査における異常例の発現率、交尾率、受胎率および出産率）を用いた。児動物の性比については，χ^2検定を用いた。なお、出産児に関するデータは、1腹の平均値を1標本とした。

結　果

1．反復投与毒性

1）一般状態および死亡（Tables 1～4，Appendices 8～11）

40 および 200 mg/kg 群で、雌雄に軽度の眼瞼下垂および自発運動低下が投与初日の投与後 30 分頃から認められ、投与後 3 時間以内に回復した。投与 2 日または 3 日にも自発運動低下が散見された。さらに、200 mg/kg 群では、一過性の軽度な流涎が投与 14 日以降の投与後 30 分以内に散見された。また、投与 42 日（哺育 1 日）以降に下顎部の軽度腫脹、軽度削痩および紅涙を呈する 1 匹の母動物(動物番号 547)がみられ、別の 1 匹の母動物（動物番号 537）は、哺育 1 日の朝に下顎部の軽度腫脹を伴って死後発見された。8 mg/kg 群では、一般状態の変化は認められなかった。

なお、対照群で、哺育 4 日までに全児死亡がみられた 1 匹の母動物（動物番号 501）に軽度の削痩が哺育 2 日および 3 日に認められた。また、全ての被験物質投与群で着色尿（黄色）が、投与期間を通じて全例に観察され、着色の程度は用量依存的に増強した。

2）体重（Figures 1，2，Tables 5，6，Appendices 12，13）

200 mg/kg 群で、投与 8 日以降、雌雄に体重増加の抑制傾向が認められ、雌においては、妊娠 14 日および 20 日と哺育 4 日の体重並びに交配前の投与 1～15 日および妊娠 0～20 日の体重増加量に有意差が認められた。8 および 40 mg/kg 群では、雌雄ともに体重および体重増加量に対照群と比べて有意な変化は認められなかった。

3）摂餌量（Figures 3，4，Tables 7，8，Appendices 14，15）

200 mg/kg 群で、雄においては投与 1 日の摂餌量に有意な減少が認められた。雌では妊娠 14 日の摂餌量に有意な減少が認められ、以降哺育 3 日まで低値傾向を示した。8 および 40mg/kg 群では、雌雄ともに投与期間を通して摂餌量に有意な変化は認められなかった。

4）剖検（Tables 9，10，Appendices 16，17）

200 mg/kg 群で、脾臓の軽度黒色化が、雄の 7 匹および雌の 10 匹に認められた。哺育 1 日に死亡した雌の 1 匹には、肺の暗赤色化が認められた。また、発現が散発

的で、被験物質の投与との関連性の認められない変化として、肝臓の軽度黄色化が対照群の雄の1匹および200 mg/kg群の雄の1匹、腎臓の片側性嚢胞形成が8 mg/kg群の雌の1匹並びに脾臓の被膜軽度肥厚が200 mg/kg群の雄の1匹に認められた。

5）器官重量（Tables 11，12，Appendices 19～22）

200 mg/kg群で、雌雄に肝臓の相対重量、さらに雄に脾臓の相対重量、雌に脾臓の絶対および相対重量のいずれも有意な高値が認められた。同群の雌の腎臓は、相対重量で有意な高値を示したが、絶対重量は低値傾向にあった。8および40 mg/kg群では、秤量した各器官に有意な変化は認められなかった。

6）病理組織学検査（Tables 13～15，Appendices 16～18）

（1）生殖器系以外の器官

200 mg/kg群で、雌雄に脾臓の髄外造血亢進傾向および褐色色素沈着増加傾向並びに雄の2匹に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また、雌の死亡例では、肺のうっ血水腫および腸間膜リンパ節・顎下リンパ節の褐色色素沈着が認められた。

被験物質投与とは無関係な変化として、対照群および200 mg/kg群で雌雄に肝臓の小葉周辺帯肝細胞脂肪変性、雌に肝臓の巣状壊死が認められたが、両群の発現率や変化の程度に差は認められなかった。剖検で、被験物質の投与とは無関係に認められた腎臓の片側性嚢胞形成例には孤立性嚢胞が、脾臓の被膜肥厚部には被膜の線維性肥厚が確認された。対照群で認められた全児死亡の雌親には、特記すべき所見は認められなかった。

（2）生殖器系器官

雄の精巣（精子形成サイクル検査を含む）、精巣上体、雌の卵巣に変化は認められなかった。対照群で認められた全児死亡の雌親の下垂体、子宮および乳腺にも変化は認められなかった。

2．生殖発生毒性

1）親動物に及ぼす影響（Table 16，Appendices 23～25）

（1）性周期検査

群分け時から交配前までの雌において、対照群では、概ね 4 日の性周期を示し、

平均性周期は 4.1 日であった。被験物質投与群では、いずれの個体も 4 日周期を示し、平均性周期は 4.0 日であった。

(2) 交尾率および受胎率

交尾は全例で成立し、交尾率および受胎率はいずれの投与群とも 100%であった。また、交尾成立に要する期間にも、対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。なお、8 および 200 mg/kg 群でそれぞれ 1 匹の雌(動物番号 513 および 542) に交配開始後、発情休止期の持続がみられ、その後、それぞれ交配開始後 12 および 13 日に発情休止期から発情前期へとスメア像が動き始め、それぞれ翌日に交尾が確認された。この 2 匹の雌は、交配開始前までは正常な性周期を示していたことから、交配開始後、偽妊娠を起こしたものと判断された。

(3) 黄体数、着床数および着床率

被験物質投与各群の黄体数、着床数および着床率は、対照群と比べて有意差は認められなかった。

(4) 出産率および妊娠期間

出産率は、いずれの投与群とも 100%であり、妊娠期間についても、被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

(5) 分娩および哺育状態

対照群で哺育 1 日から哺育行動を中止し、哺育 4 日までに全児死亡が確認された 1 例 (動物番号 501) を除いて、いずれの投与群とも分娩および哺育状態に異常は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 17, Appendix 26)

200 mg/kg 群で、雌雄とも哺育 0 日および 4 日の体重に有意な低値が認められた。8 および 40 mg/kg 群では、体重を含め、一腹当たりの総出産児数、分娩率、新生児数、出生率、性比および哺育 4 日の生存率に、対照群と比べて有意差は認められず、新生児の一般状態にも異常は認められなかった。

(2) 形態 (Tables 18, 19, Appendices 27, 28)

対照群で矮小児が 1 匹 (発現率 0.5%) 認められた他は、いずれの群においても外表および内臓異常を有する児動物は認められなかった。内臓変異については、胸

腺の頸部残留が対照群で2例(1.0%)、8 mg/kg群で1例(0.6%)および200 mg/kg群で2例(1.2%)、左臍動脈遺残が40 mg/kg群で1例(0.6%)、尿管屈曲が200 mg/kg群で1例（0.5%）みられ、これらのいずれかの変異を有する児動物は、対照群で2匹（1.0%)、8mg/kg群で1匹（0.6%)、40 mg/kg群で1匹（0.6%）および200 mg/kg群で3匹（1.8%）であり、これらの発現率に有意差は認められず、また、用量依存的な増加傾向も認められなかった。

考　察

1．反復投与毒性について

投与開始初期において、急性的毒性症状と思われる自発運動低下および眼瞼下垂が、40 mg/kg 以上の群の雌雄に認められ、200mg/kg 群では雄で体重増加の抑制傾向、雌では妊娠および哺育期間の体重の有意な低値および摂餌量の低値傾向が認められた。

病理学検査においては、200mg/kg 群で、脾臓は雌雄とも肉眼的に黒色化し、雄は相対重量、雌は絶対および相対重量の高値が認められ、病理組織学的には髄外造血の亢進およびヘモジデリンと思われる褐色色素の沈着増加が観察された。

さらに、200mg/kg 群で、雌雄に肝臓相対重量の高値が認められ、雄で肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が確認された。

本被験物質は、ラットへの反復経口投与により、自発運動の低下等の症状、赤血球の破壊亢進による貧血所見並びに脾臓、肝臓および心臓に対する毒性影響等の発現することが報告[2)]されており、本試験においても、類似した結果が認められた。

また、200 mg/kg 群で認められた雌の死亡例は、臨床的には下顎部の腫脹、病理組織学検査では肺水腫が認められ、死因は心機能の低下およびそれに伴う循環障害によるものと推察された。

なお、200 mg/kg 群の雌に認められた腎臓相対重量の高値について、絶対重量はむしろ低値傾向にあり、また、28 日間反復投与毒性試験では、300 mg/kg/day 用量においても腎臓に病理組織学的変化は認められていない[2)]ことから、体重の低値に伴う二次的所見と考えられる。

また、黄色尿の排泄が認められたが、これは毒性とは無関係な被験物質代謝物の尿中排泄によるものと考えられている[2)]。さらに、200 mg/kg 群でみられた流涎も、28 日間毒性試験で認められた[2)]と同様に、投与後短時間に発現する一過性の変化で、神経毒性を示唆する変化を伴っていないことから、単なる投与液の味に対する忌避反応と考えられ、毒性影響を示唆する変化ではないと判断された。

2．生殖発生毒性について

雌雄親動物の生殖能に対する影響について、観察した各指標とも対照群と比べて有意な変化は認められず、雌雄の生殖器官にも病理学的変化は認められなかった。

児の発生に対する影響ついて、200 mg/kg 群で雌雄の体重が有意に小さかった。これは、投与の初期から妊娠期間を経て哺育期まで認められた母動物の体重増加抑制および妊娠中期以降に認められた摂餌量の低下による母動物の低栄養状態に起因する二次的な児の発育遅延と解される。

形態への影響については、自然発生的に認められる[3] ごく少数例の内臓変異を認めたのみであり、催奇形性は示唆されなかった。

以上の結果から、4-ニトロ-o-アニシジンのラットを用いた簡易生殖毒性試験において、親動物への反復投与における無影響量は雄雌ともに 8 mg/kg/day、雌雄親動物の生殖能および児動物の発生に対する無影響量は、それぞれ 200 および 40 mg/kg/day と判断された。

文　献

1) Richardson, M. L. and Gangolliet, S. "The Dictionary of Substances and their Effects" , Volume 5, p. 513, the royal society of chemistry, England, 1994.

2) 4-ニトロ-o-アニシジンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, 化学物質毒性試験報告, 5, 223-236, 1997.

3) Morita, H., et al, (1987). Spontaneous malformations in laboratory animals. Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice, *Cong. Anom.*, 27, 147-206.

4-ニトロ-o-アニシジンのラットを用いる簡易生殖毒性試験

(試験番号：04-213-2)

最終報告書　添付資料A

(図・群別平均値表)

財団法人　畜産生物科学安全研究所

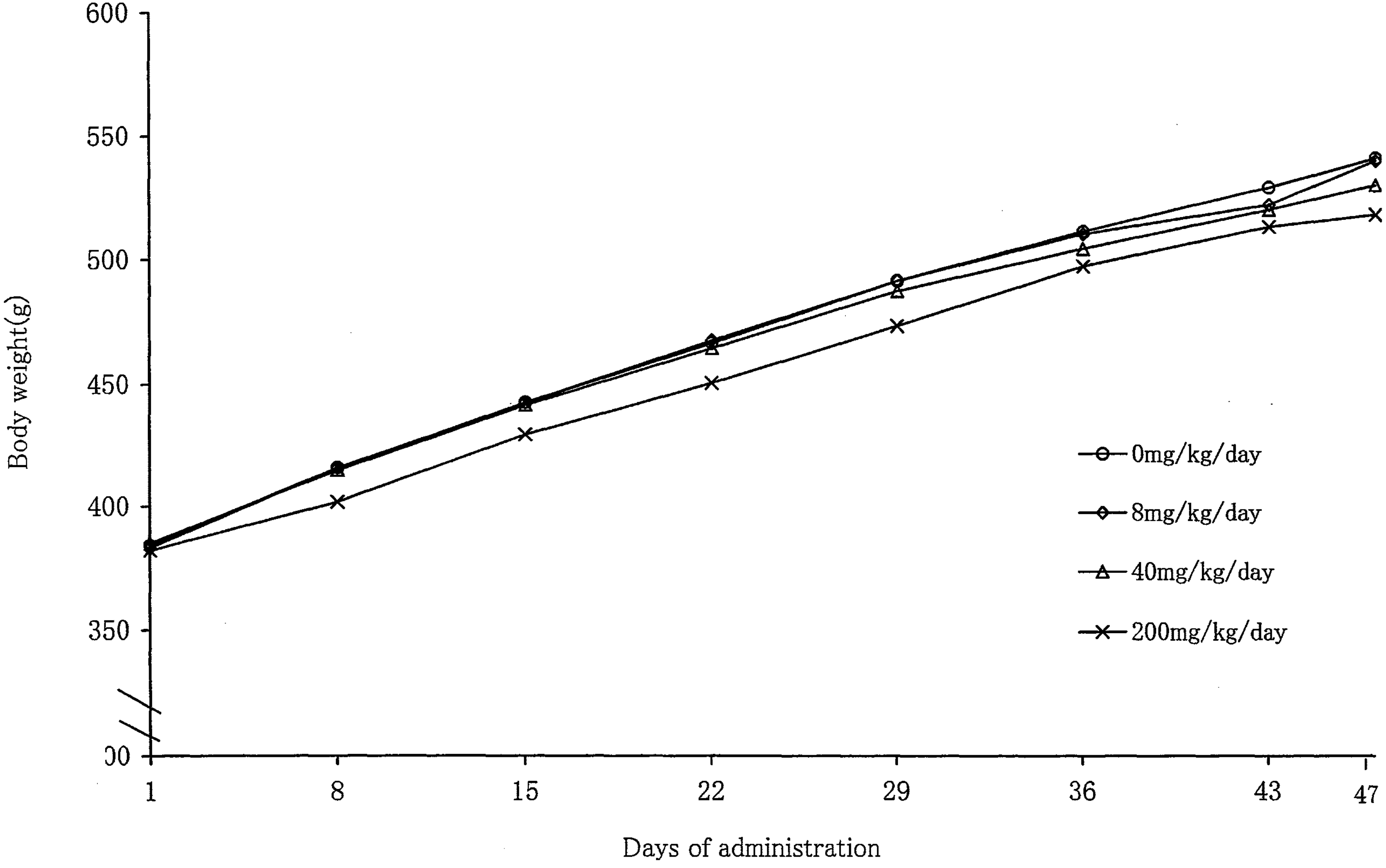

Fig. 1 Body weight changes of male rats treated with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

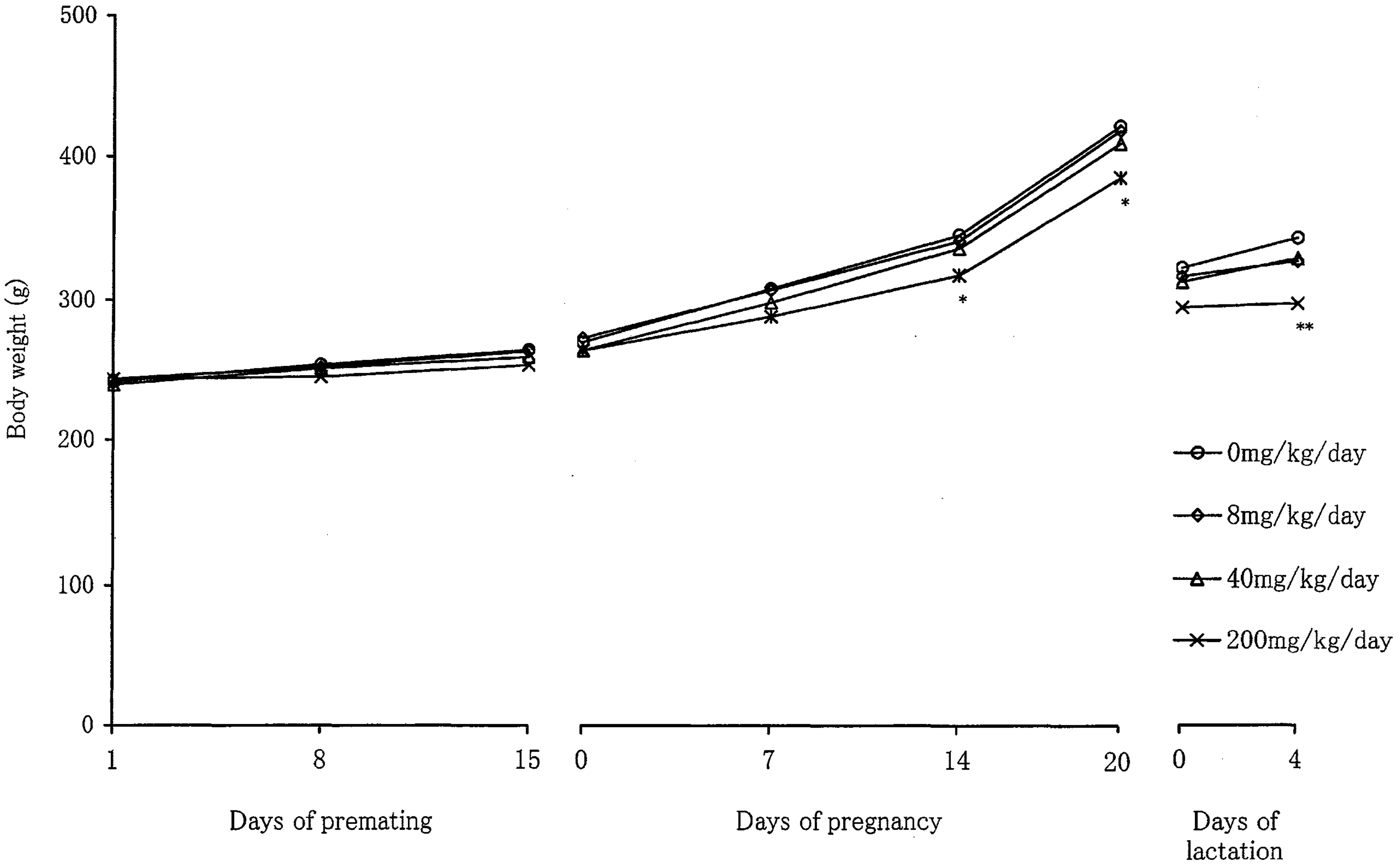

Fig. 2 Body weight changes in female rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

* : Significantly different from control at 5% level of probability.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

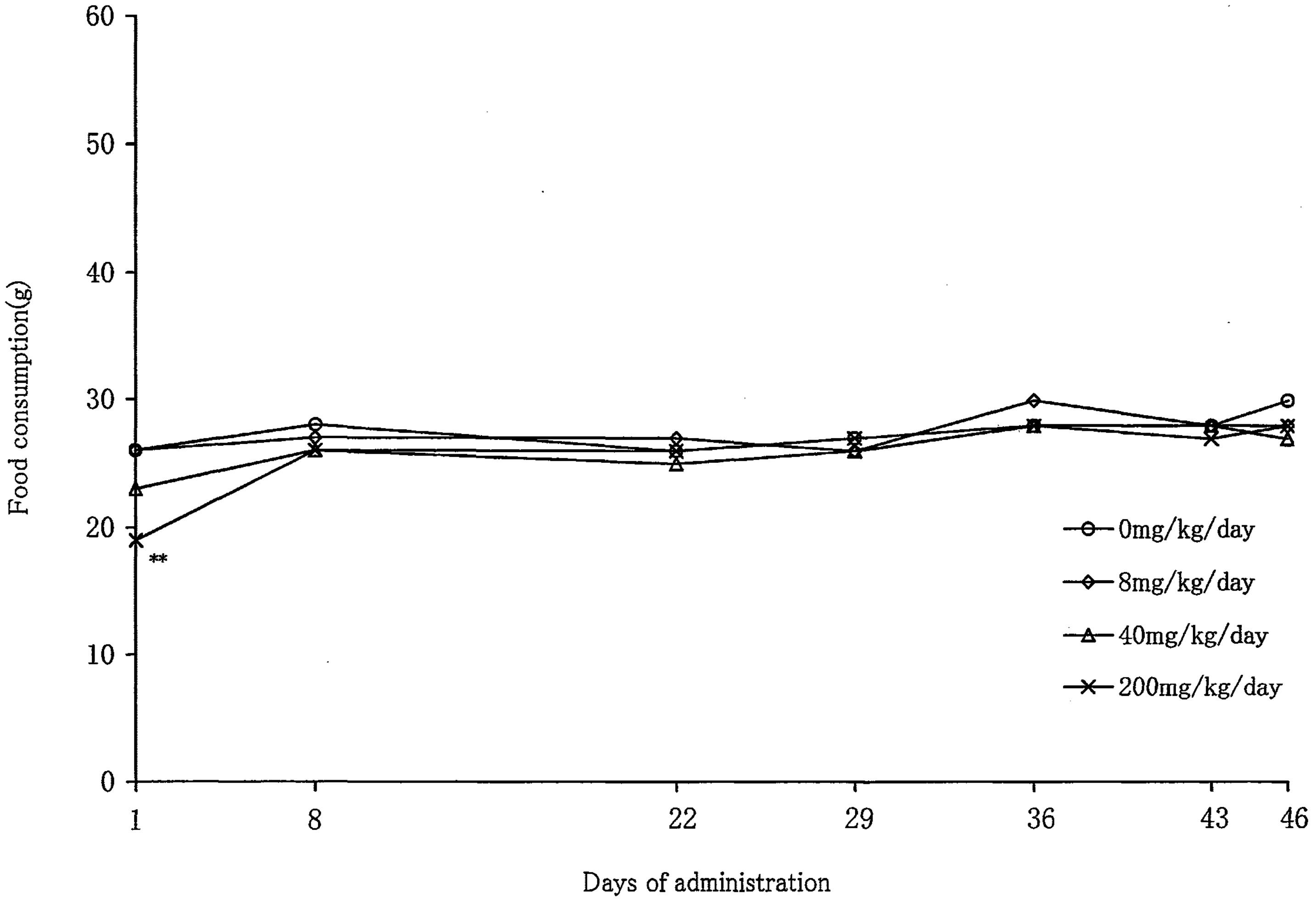

Fig.3 Food consumption changes of male rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

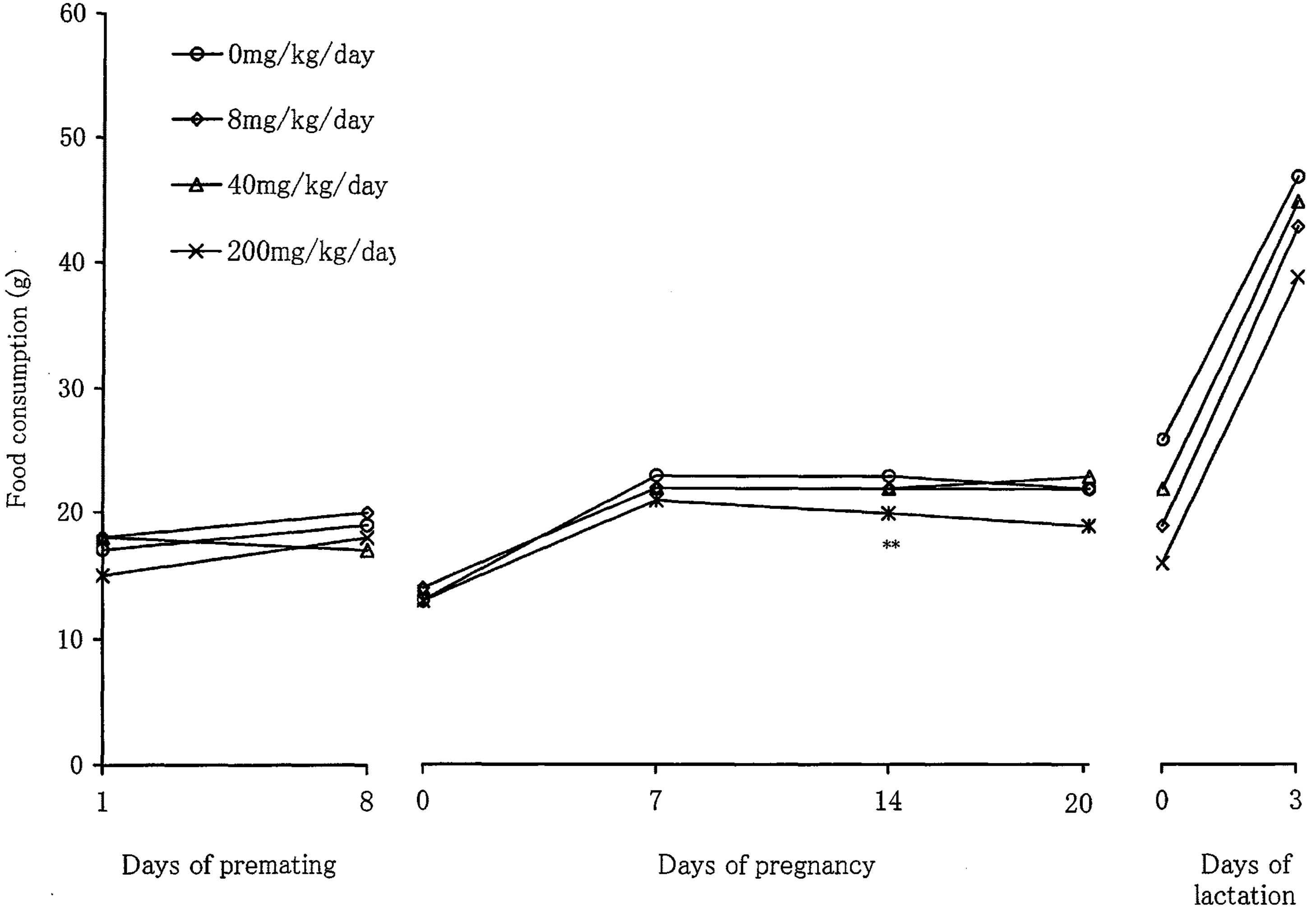

Fig. 4 Food consumption changes in female rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 1 Mortality rate of male rats treated orally with aniline, 2–methoxy–4–nitro– in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of animals that died	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0

Table 2 Mortality rate of female rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of animals that died	0	0	0	1
Mortality (%)	0	0	0	2.1

Table 3 Clinical signs of male rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

		Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
		Fate	TK	TK	TK	TK
Clinical signs	Grade	No. of animals examined	12	12	12	12
Chromaturia, yellowish	-		12	0	0	0
	+		0	12 **	0	0
	++		0	0	12 **	0
	+++		0	0	0	12 **
Decrease in locomotor activity	-		12	12	2	0
	+		0	0	10 **	12 **
Ptosis	-		12	12	4	0
	+		0	0	8 **	12 **
Salivation	-		12	12	12	4
	+		0	0	0	8 **

TK : Terminal kill.
- : Negative. + : Slight. ++ : Moderate. +++ : Severe.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 4 Clinical signs of female rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

		Dose (mg/kg/day)	0			8	40	200		
		Fate	TK	PD	Total)	TK	TK	TK	FD	Total)
Clinical signs	Grade	No. of animals examine	11	1	(12)	12	12	11	1	(12)
Chromaturia, yellowish	-		11	1	(12)	0	0	0	0	(0)
	+		0	0	(0)	12 **	0	0	0	(0)
	++		0	0	(0)	0	12 **	0	0	(0)
	+++		0	0	(0)	0	0	11	1	(12) **
Decrease in locomotor activit	-		11	1	(12)	12	11	2	0	(2)
	+		0	0	(0)	0	1	9	1	(10) **
Ptosis	-		11	1	(12)	12	11	7	1	(8)
	+		0	0	(0)	0	1	4	0	(4) *
Salivation	-		11	1	(12)	12	12	11	0	(11)
	+		0	0	(0)	0	0	0	1	(1)
Emaciation	-		11	0	(11)	12	12	10	1	(11)
	+		0	1	(1)	0	0	1	0	(1)
Reddish tear	-		11	1	(12)	12	12	10	1	(11)
	+		0	0	(0)	0	0	1	0	(1)
Swelling of mandible region	-		11	1	(12)	12	12	10	0	(10)
	+		0	0	(0)	0	0	1	1	(2)

TK : Terminal kill on day 5 after parturition. PD : Killed because all pups died after delivery.
FD : Found dead on day 1 after parturition.
- : Negative. + : Slight . ++ : Moderate. +++ : Severe.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 5 Body weights of male rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose	Days of administration								Gain
(mg/kg/day)	1	8	15	22	29	36	43	47	1～47
0	384 ± 16 (12)	416 ± 22 (12)	443 ± 25 (12)	467 ± 26 (12)	492 ± 31 (12)	512 ± 34 (12)	530 ± 35 (12)	542 ± 37 (12)	158 ± 28 (12)
8	383 ± 19 (12)	416 ± 27 (12)	443 ± 30 (12)	468 ± 32 (12)	492 ± 33 (12)	511 ± 37 (12)	523 ± 35 (12)	541 ± 37 (12)	158 ± 20 (12)
40	385 ± 24 (12)	415 ± 34 (12)	442 ± 45 (12)	465 ± 49 (12)	488 ± 55 (12)	505 ± 62 (12)	521 ± 70 (12)	531 ± 73 (12)	146 ± 50 (12)
200	382 ± 19 (12)	402 ± 25 (12)	430 ± 26 (12)	451 ± 30 (12)	474 ± 36 (12)	498 ± 33 (12)	514 ± 39 (12)	519 ± 41 (12)	137 ± 29 (12)

Each value is expressed as mean±S.D.
(n): No. of animals.

Table 6 Body weights of female rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Days of premating 1	8	15	Gain 1~15	Days of pregnancy 0	7	14	20	Gain 0~20	Days of lactation 0	4	Gain 0~4
0	241 ± 11 (12)	254 ± 16 (12)	265 ± 18 (12)	23 ± 12 (12)	271 ± 14 (12)	310 ± 18 (12)	348 ± 24 (12)	424 ± 27 (12)	153 ± 15 (12)	325 ± 28 (12)	346 ± 21 (11)	18 ± 13 (11)
8	243 ± 13 (12)	252 ± 14 (12)	264 ± 18 (12)	21 ± 8 (12)	274 ± 19 (12)	309 ± 24 (12)	344 ± 28 (12)	421 ± 31 (12)	147 ± 16 (12)	319 ± 29 (12)	330 ± 40 (12)	11 ± 30 (12)
40	239 ± 15 (12)	251 ± 12 (12)	260 ± 14 (12)	21 ± 10 (12)	265 ± 17 (12)	300 ± 17 (12)	339 ± 20 (12)	412 ± 25 (12)	147 ± 13 (12)	315 ± 20 (12)	332 ± 22 (12)	17 ± 14 (12)
200	243 ± 14 (12)	245 ± 15 (12)	254 ± 15 (12)	11 ** ± 6 (12)	265 ± 23 (12)	290 ± 23 (12)	320 * ± 24 (12)	388 * ± 35 (12)	123 ** ± 17 (12)	297 ± 28 (12)	300 ** ± 21 (11)	6 ± 25 (11)

Each value is expressed as mean±S.D.
(n): No. of animals.
* : Significantly different from control at 5% level of probability.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 7 Food consumption of male rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Days of administration 1	8	22	29	36	43	46
0	26 ± 3 (12)	28 ± 3 (12)	26 ± 2 (12)	27 ± 3 (12)	28 ± 3 (12)	28 ± 3 (12)	30 ± 3 (12)
8	26 ± 3 (12)	27 ± 3 (12)	27 ± 4 (11)	26 ± 4 (12)	30 ± 4 (12)	28 ± 3 (12)	28 ± 4 (12)
40	23 ± 3 (12)	26 ± 4 (12)	25 ± 5 (12)	26 ± 6 (12)	28 ± 6 (12)	28 ± 5 (12)	27 ± 5 (12)
200	19 ** ± 6 (12)	26 ± 2 (12)	26 ± 4 (11)	27 ± 4 (12)	28 ± 4 (12)	27 ± 6 (12)	28 ± 3 (12)

Each value is expressed as mean±S.D.
(n) : No. of animals.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 8 Food consumption of female rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose	Days of premating		Days of pregnancy				Days of lactation	
(mg/kg/day)	1	8	0	7	14	20	0	3
0	17 ± 4 (12)	19 ± 4 (12)	13 ± 2 (12)	23 ± 4 (12)	23 ± 4 (12)	22 ± 4 (12)	26 ± 9 (12)	47 ± 8 (11)
8	18 ± 3 (12)	20 ± 2 (12)	14 ± 2 (12)	22 ± 3 (12)	23 ± 2 (12)	22 ± 6 (12)	19 ± 11 (12)	43 ± 15 (12)
40	18 ± 3 (12)	17 ± 4 (12)	14 ± 3 (12)	22 ± 3 (12)	22 ± 3 (12)	23 ± 4 (12)	22 ± 6 (12)	45 ± 4 (12)
200	15 ± 3 (12)	18 ± 2 (12)	13 ± 3 (12)	21 ± 4 (12)	20 ** ± 3 (12)	19 ± 4 (12)	16 ± 7 (11)	39 ± 9 (11)

Each value is expressed as mean±S.D.
(n) : No. of animals.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 9 Incidence of necropsy findings of male rats treated with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organs	: Findings	Dose(mg/kg/day)	0	8	40	200
		Fate	TK	TK	TK	TK
		No. of animals examined	12	12	12	12
Liver	: Yellowish	−	11	12	12	11
		+	1	0	0	1
Spleen	: Blackish	−	12	12	12	5 **
		+	0	0	0	7
	Thickening, capsule	−	12	12	12	11
		+	0	0	0	1

− : Negative. + : Slight.
TK : Terminal killing.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 10 Incidence of necropsy findings of female rats treated with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Dose(mg/kg/day)		0			8	40	200		
	Fate		TK	PD	(Total)	TK	TK	TK	FD	(Total)
	No. of animals examined		11	1	(12)	12	12	11	1	(12)
Lung : Dark red		–	11	1	(12)	12	12	11	0	(11)
		+	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)
Spleen : Blackish		–	11	1	(12)	12	12	1	1	(2)**
		+	0	0	(0)	0	0	10	0	(10)
Kidney : Cysts, left		–	11	1	(12)	11	12	11	1	(12)
		+	0	0	(0)	1	0	0	0	(0)

– : Negative. + : Slight.
TK : Terminal killing on day 5 after parturition.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 11 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	B.W. (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Testis (g)	Epididymis (g)
	0	12	541	19.24	3.13	0.75	3.48	1.54
Absolute			39	1.70	0.26	0.06	0.31	0.14
	8	12	541	19.25	3.09	0.82	3.68	1.44
			37	1.74	0.31	0.13	0.36	0.09
	40	12	535	19.56	2.99	0.81	3.52	1.54
			74	5.48	0.44	0.15	0.31	0.12
	200	12	528	21.17	3.11	0.85	3.56	1.46
			42	2.68	0.41	0.11	0.36	0.21
	0	12	541	3.56	0.58	0.14	0.65	0.29
Relative @			39	0.15	0.05	0.01	0.07	0.04
	8	12	541	3.56	0.57	0.15	0.68	0.27
			37	0.15	0.06	0.02	0.08	0.03
	40	12	535	3.61	0.56	0.15	0.66	0.29
			74	0.45	0.04	0.01	0.08	0.03
	200	12	528	4.01 **	0.59	0.16 **	0.67	0.28
			42	0.28	0.06	0.02	0.04	0.03

Each value is expressed as mean ± S.D.
@ : Relative organ weight per 100g body weight.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 12 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	B.W. (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)
	0	12	340	15.54	1.94	0.67
Absolute			40	3.08	0.18	0.15
	8	12	333	15.19	1.92	0.65
			42	3.01	0.25	0.13
	40	12	337	16.08	1.88	0.71
			24	1.69	0.19	0.08
	200	11	307	15.87	1.86	0.88 *
			23	1.90	0.14	0.21
	0	12	340	4.53	0.58	0.20
Relative @			40	0.55	0.13	0.04
	8	12	333	4.53	0.59	0.19
			42	0.51	0.11	0.03
	40	12	337	4.77	0.56	0.21
			24	0.30	0.03	0.02
	200	11	307	5.15 **	0.61 *	0.29 **
			23	0.37	0.03	0.06

Each value is expressed as mean ± S.D.
@ : Relative organ weight per 100g body weight.
* : Significantly different from control at 5% level of probability.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 13 Incidence histopathological findings of male rats treated with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Dose(mg/kg/day)	0	8	40	200
	Fate	TK	TK	TK	TK
	No. of animals	12	5	5	12
Liver : Degeneration, fatty, hepatocyte, periportal	−	9	4	4	10
	+	3	1	1	2
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	−	12	5	5	10
	+	0	0	0	2
Spleen : Hematopoiesis, extramedullary	−	0	0	0	0
	+	12	5	5	7
	++	0	0	0	5 *
Deposit, pigment, brown	−	0	0	0	0
	+	12	5	5	5
	++	0	0	0	7 **
Fibrous thickening, capsule	−	12	5	5	11
	+	0	0	0	1
Testis and epididymis : Abnormality	−	12	#	#	12
	+	0	#	#	0

− : Negative. + : Slight. ++ : Moderate. # : Not examined. TK : Terminal killing.
* : Significantly different from control at 5% level of probability.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 14 Incidence histopathological findings of female rats treated with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Dose(mg/kg/day)	0			8	40	200		
	Fate	TK	PD	Total	TK	TK	TK	FD	Total
	No. of animals	11	1	12	5	5	11	1	12
Lung : Congestive edema	−	#	#	#	#	#	#	0	0
	+	#	#	#	#	#	#	1	1
Liver : Degeneration, fatty, hepatocyte, periportal	−	4	0	4	#	#	3	1	4
	+	7	1	8	#	#	8	0	8
Necroosis, focal	−	11	0	11	#	#	10	1	11
	+/++	0	1	1	#	#	1	0	1
Kidney : Cyst, solitary, unilateral	−	#	#	#	0/1[a]	#	#	#	#
	++	#	#	#	1/1	#	#	#	#
Spleen : Hematopoiesis, extramedullary	−	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	2	1	3] (12)	2] (5)	1] (5)	0	1	1] (9)
	++	9	0	9]	3]	4]	8	0	8]
	+++	0	0	0	0	0	3	0	3
Deposit, pigment, brown	−	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	9	0	9	4	3	2	0	2
	++	2	1	3	1	2	9	1	10**
Lymph nodes, mesenteric and submandibular	−	#	#	#	#	#	#	0	0
: Deposit, pigment, brown	+	#	#	#	#	#	#	1	1
Ovary : Abnormality	−	11	1	12	#	#	11	1	12
	+	0	0	0	#	#	0	0	0
Uterus, pituitary and mammary gland	−	#	1	1	#	#	#	#	#
: Abnormality	+	#	0	0	#	#	#	#	#

− : Negative. + : Slight. ++ : Moderate. +++ : Severe. #: Not examined. a : Examined the organ with macroscopical abnormality
TK : Terminal killing on day 5 after parturition.
PD: Killed because all pups died after delivery. FD : Found dead on day 1 after parturition.
No abnormalities were detected in the brain, thyroid, parathyroid, trachea, heart, adrenal and uterus from a animal that died of 200mg/kg group.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 15 The number of cells in seminiferous epithelia assessed by the induvidual examination in male rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	No. of animals		Stage II-III			Stage V			Stage VII			Stage XII	
			G	P	T	G	P	T	G	R/P	T	G	Z/P
0	12	Mean	0.54	2.19	6.67	0.68	2.29	6.97	0.08	3.55	6.75	0.09	5.04
		S.D.	0.11	0.30	0.94	0.07	0.24	0.57	0.01	0.46	0.84	0.02	0.44
200	12	Mean	0.55	2.28	6.72	0.68	2.24	6.80	0.08	3.73	6.78	0.09	4.97
		S.D.	0.07	0.24	0.63	0.07	0.18	0.62	0.01	0.47	0.72	0.02	0.60

G : spermatogonia.
P : pachytene spermatocyte.
R : preleptotene spermacyte.
Z : zygotene spermacyte.
T : round spermatid.

Table 16 Reproduction results of rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
Estrous cycle (days, Mean ± S.D.)	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs with successful copulation	12	12	12	12
Copulation index (%)	100	100	100	100
Pairing days until copulation (days, Mean ± S.D.)	2.6 ± 1.2	3.5 ± 3.2	2.4 ± 1.1	3.4 ± 3.6
No. of pregnant females	12	12	12	12
Fertility index (%)	100	100	100	100
No. of corpora lutea (Mean ± S.D.)	16.8 ± 1.4	16.1 ± 1.2	16.8 ± 1.7	16.3 ± 2.1
No. of implantation sites (Mean ± S.D.)	15.7 ± 2.0	15.4 ± 1.3	15.5 ± 1.4	15.8 ± 1.8
Implantation index (%, Mean ± S.D.)	92.9 ± 7.1	96.0 ± 5.7	92.8 ± 6.2	97.3 ± 6.3
No. of pregnant females with parturition	12	12	12	12
Gestation length (days, Mean ± S.D.)	22.3 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.2 ± 0.4	22 ± 0
No. of pregnant females with live pups	12	12	12	12
Gestation index (%)	100	100	100	100
No. of pregnant females with live pups on day 4	11	12	12	11

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated) ×100.
Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation) ×100.
Gestation index = (No. of females with live pups/No. of pregnant females) ×100.

Table 17 Litter results of rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	8	40	200
No. of pups born	14.3 ± 2.5	14.8 ± 1.5	14.4 ± 1.6	15.1 ± 1.7
Delivery index (%)	91.2 ± 7.5	96.2 ± 4.3	92.9 ± 4.6	95.5 ± 7.6
No. of pups alive on day 0 of lactation				
Total	14.2 ± 2.6	14.3 ± 1.4	14.4 ± 1.6	14.9 ± 2.0
Male	7.5 ± 2.7	7.2 ± 1.4	6.9 ± 2.3	6.7 ± 2.2
Female	6.7 ± 2.8	7.2 ± 1.4	7.5 ± 1.7	8.3 ± 2.6
Live birth index (%)	98.8 ± 2.9	96.8 ± 4.2	100	98.7 ± 4.4
Sex ratio(Male/Female)	1.10	1.02	0.92	0.79
No. of pups alive on day 4 of lactation				
Total	12.5 ± 4.5	14.3 ± 1.4	14.3 ± 1.5	14.3 ± 2.1
Male	6.9 ± 3.5	7.2 ± 1.4	6.8 ± 2.2	6.5 ± 2.4
Female	5.6 ± 2.7	7.2 ± 1.4	7.4 ± 1.7	7.7 ± 2.2
Viability index (%)	90.9 ± 28.7	100	98.9 ± 2.5	96.6 ± 8.6
Body weight of live pups (g)				
on day 0				
Male	6.8 ± 0.8	7.1 ± 0.8	6.7 ± 0.4	6.2 ± 0.6 *
Female	6.5 ± 0.8	6.6 ± 0.8	6.4 ± 0.3	5.8 ± 0.5 *
on day 4				
Male	11.5 ± 1.7	10.9 ± 1.7	11.0 ± 0.9	9.3 ± 1.3 **
Female	11.2 ± 1.6	10.3 ± 1.7	10.7 ± 0.5	8.8 ± 1.1 **

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.
Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.
Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.
Sex ratio = Total number of male pups/Total number of female pups.
Each value is expressed as Mean±S.D.,except sex ratio.
* : Significantly different from control at 5% level of probability.
** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 18 External findings of pups from pregnant rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	8	40	200
No. of pups examined	172	177	173	180
No. of pups with external malformations#	1 (0.5±1.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
External malformations#				
Dwarf	1 (0.5±1.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

: No. of pups (Mean±S.D. of individual litter percentages).

Table 19 Visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with aniline, 2-methoxy-4-nitro- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	8	40	200
No. of pups examined	172	177	173	178
No. of pups with visceral malformations	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No. of pups with visceral variations#	2 (1.0±3.4)	1 (0.6±1.9)	1 (0.6±2.0)	3 (1.8±3.2)
Visceral variations#				
Thymic remnant in neck	2 (1.0±3.4)	1 (0.6±1.9)	0 (0)	2 (1.2±2.9)
Persistent left umbilical artery	0 (0)	0 (0)	1 (0.6±2.0)	0 (0)
Bending ureter	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5±1.8)

: No. of pups (Mean±S.D. of individual litter percentages).