

3-ニトロベンゼナミン
(3-Ni trobenzenamine)
のラットにおける
簡易生殖毒性試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター 秦 野 研 究 所

					目	次		
								頁
要	統	J	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •					1
緒								6
試	鈴材	料および	方法					7
	1.	被験物質						7
	2.	使用動物	および節	育条件		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		7
	3.	群分け法	<u>.</u>			•••••		8
	4.	投与量、	群構成、	投与期間	および投	与方法 …		8
	5.	予備試験	(投与量	しの設定)				9
	6.	観察方法						11
	7.	動物の個	体識別法	.				15
	8.	統計処理						15
結	果		•••••					16
Ι.	反	復投与毒	性			••		16
	1.	雄動物				• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	·	16
	2.	雌動物	*********					17
Ι.	生	殖・発生	毒性			*****		19
	1.	交配成績	į					19
	2.	黄体数、	着床数、	着床率				19
	3.	出産率お	よび妊娠	期間 …				19
	4.	分娩状態						19
	5.	哺育状態						20
	6.	出生児所	見		-			20
老	変							22

文	献 ·	24
Anne Inde Tab		

既存化学物質安全性スクリーニング試験の一つとして 3-ニトロヘンモナミン (Common Synonym: m-nitroaniline, 以下m-NA) の簡易生殖毒性試験を行った。すなわち、m-NAの 0 (溶媒対照), 5, 15 および 50 mg/kg をSprague Dawley系 (Crj:CD) ラットの雌雄 (各13匹/群) に交配前 2 週間および交配期間 2 週間、さらに雌では妊娠期間を通して哺育 3 日まで経口投与し、親動物の生殖能力および次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

試験結果は以下のように要約される。

1. 反復投与毒性(親動物所見)

1.1 雄動物

1) 一般状態

死亡例は、いずれの投与群においても認められなかった。一般状態に関しては、 50 mg/kg 投与群の1例で投与期間の後半に末端部体表の褪色がみられたが、この ほかには、いずれの投与群においても被験物質の投与に起因したと推定される一般 状態の変化は認められなかった。

2) 体重および摂餌量

50 mg/kg 投与群において投与第1週の体重増加量および摂餌量が、有意な低値を示した。 15 mg/kg 以下の投与群では、被験物質の投与に起因したと推定される体重および摂餌量の変化は認められなかった。

3) 剖検所見、精巣および精巣上体重量

50 mg/kg 投与群の13例全例および 15 mg/kg 投与群の13例中3例に脾の腫大あるいは暗色化がみられた。精巣および精巣上体の重量には、被験物質の投与に起因したと推定される変化は認められなかった。

4) 精巣および精巣上体の病理組織学的所見

対照群と 50 mg/kg 投与群の全例について観察した結果、被験物質の影響を示唆する異常所見は、いずれの例にもみられなかった。

1.2 雌動物

1) 一般状態

50 mg/kg 投与群の1例が、分娩途中(妊娠23日)に死亡した。一般状態の変化としては、雄と同様に、 50 mg/kg 投与群の1例で妊娠期間の後半に末端部体表の褪色がみられたのみであった。

2) 体重および摂餌量

50 mg/kg 投与群の体重は、投与開始後、一貫して低値に推移した。しかし、有意な体重の変化は、いずれの被験物質投与群においても認められなかった。

摂餌量に関しては、 50 mg/kg 投与群において投与第1週に有意な低値がみられた。 15 mg/kg 以下の投与群の摂餌量には、被験物質の投与に起因したと推定される変化は認められなかった。

3) 剖検所見

50 mg/kg 投与群の分娩途中死亡例では、肺の浮腫様変化、脾の暗色化、胃底部 粘膜の潰瘍および糜爛などがみられたが、死因は特定できなかった。

哺育4日に剖検し、試験を完了した雌では50 mg/kg 投与群の9例中8例および15 mg/kg 投与群の10例中1例に脾の腫大あるいは暗色化が認められた。脾の暗色化は、50 mg/kg 投与群における全児死亡の雌3例中1例においても認められた。

4) 卵巣の病理組織学的所見

15 mg/kg 投与群の 3 例 (不妊 1 例、全児死亡 2 例) および 50 mg/kg 投与群の全児死亡 4 例 (死亡例を含む) について観察した結果、被験物質の影響を示唆する異常所見はいずれの例にもみられなかった。

2. 生殖発生毒性

2.1 交配成績

15 mg/kg,投与群の不妊1例を除いては、全ての雌で妊娠が成立した。すなわち雌雄の交尾能力および受胎能力には、被験物質投与の影響はなんら認められなかった。

2.2 黄体数、着床数および着床率

妊娠雌の黄体数、着床数および着床率に対照群と被験物質投与群との間で有意差 は認められなかった。

2.3 出産率および妊娠期間

出産率は、各群とも 100% を示した。また、分娩雌の妊娠期間に対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

2.4 分娩状態および哺育状態

出産後の最初の観察日(哺育1日)において陰部または腹部体表に血様汚れがみられ、分娩状態が不良であったと判断された 15 mg/kg 投与群の1例および 50 mg/kg 投与群の2例では、同日中に全児が死亡した。また、15 mg/kg 投与群の他の1例では、親動物に異常は認められなかったが、哺育2日までに全児が死亡したほか、50 mg/kg 投与群において妊娠期間の後半に末端部体表の褪色がみられた1 例では産児の全例が哺育3日までに死亡した。このほかには、いずれの投与群の雌においても分娩状態あるいは哺育状態に異常は認められなかった。

2.5 新生児所見

1) 生存性

15 および 50 mg/kg 投与群では、哺育1日の全児死亡がそれぞれ1および2例存在したことにより、この日の児数を計算の対象とした児の産出率 [(産児数/着床痕数) × 100] および出生率 [(出産生児数/着床痕数) × 100] が、対照群と比較して低値を示した。しかし、出生児の生存性の有意な低下は、いずれの被験物質投与群においても認められなかった。

2) 体重

出生児の体重には、雌雄ともに対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

3) 形態

出生日の外表観察、死亡児および哺育4日における全出生児の剖検において被験物質の投与に起因したと推定される外表および内臓の異常は認められなかった。また、対照群と50 mg/kg 投与群について実施した骨格観察においても骨格異常あるいは変異の発生頻度が、被験物質投与群において増加する傾向はみられなかった。

3. 評価

以上の試験成績からm-NAの 15 mg/kg/day 以上の量は、5~7週間の連続投与によって雌雄ラットに脾の腫大あるいは暗色化を来す反復投与毒性発現量であり、一部の雌では分娩あるいは哺育機能に障害がおよぶ可能性が示唆される。また 50 mg/kg/day は、雌雄ラットに体重増加の抑制あるいは摂餌量の減少を来し、さらに分娩途中の雌1例が死亡したことから、本化合物の妊娠ラットに対する最大耐量を若干凌駕した量と考えられる。なお、本化合物については雄ラットに対する精巣毒性が知られているが、本試験条件下においては、雄ラットの生殖能力に対して明らかな毒性を示さなかった。また、 50 mg/kg/day を親動物に投与してもその出生児の

発育、生存性および形態には悪影響を及ぼさなかった。これらのことから、本試験 条件下では、m-NAの雌雄ラットに対する反復投与毒性に関する無影響量および雌ラットの生殖能力に対する無影響量は5 mg/kg、雄ラットの生殖能力に対する無影響量は50 mg/kg と判断される。 3-ニトロベンゼナミン(Common Synonym: m-nitroaniline, m-NA) は benzene の単環ニトロ化合物である nitrobenzene の m- 位に置換基として -NH2 基を一つ付加した芳香族ニトロ化合物であり、アゾ染料、 yellow-G 等の染料の原料として、あるいは有機合成の中間体等に広く使用されている。また、本化合物は、m-dinitrobenzene (m-DNB)の生体における代謝物であり、その毒性については、m-DNB と同様に反復投与によりラットに精巣毒性を示すこと、メトヘモグロビン血症を惹起すること10のほか、ランクA (通産省) に該当する比較的強い変異原性を有することなどが報告されている20。

今回、 OECD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として3-ニトロベンゼナミンの簡易生殖毒性試験を行い、本化合物の生殖・発生毒性について検討したのでその結果を報告する。

試験材料および方法

1.被験物質

3-ニトロベンゼナミン [ロット番号, ; 純度, 99.9%; CAS No. 99-09-02; Common Synonym, m-nitroaniline (m-NA)] は、分子量 138.13、融点 114℃、沸点 306.4℃の水に難溶な淡橙黄色針状の結晶性粉末であり、使用時まで乾燥・冷暗条件下で密閉保管した (Annex 1)。

本被験物質は 0.5% CMC-Na水溶液に懸濁し、いずれの用量においても1回の投与液量が5 ml/kg になるように含量を調整して投与検体とし、調製後は冷暗条件下で密閉保管して調製後7日以内に投与した。調製液中の被験物質は、室温・遮光の保管条件下で少なくとも7日間安定であり、均一性も維持された(Annex 2-1, 2)。また、使用した投与検体の含量測定結果にも問題はなかった(Annex 4)。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入した日本チャールス・リバー㈱厚木飼育センター生産の Sprague-Dawley 系ラット (Crj:CD, SPF)を使用した (Annex 3)。購入した動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、一般状態に異常が認められなかったものを試験に供した(群分け時体重範囲:雌 183.3~241.3 g、雄:273.1~323.6 g)。

各動物は、温度24±1℃、相対湿度55±5%、換気回数約15回/時間、照明12時間(午前7時~午後7時)に調節されたバリアーシステムの飼育室で、金属製金網床ケージ(22×27×19cm、日本ケージ㈱)に個別に収容して飼育し、固型飼料(CA-1、日本クレア㈱)および水道水を自由に摂取させた。妊娠18日以後の母動物には、飼育ケージの床に金属製床板を敷き、床敷としてホワイトフレーク®(日本チャールス・リバー㈱)を適宜供給した。

供給した飼料、水、および床敷には試験に支障を来す可能性の考えられる夾雑物

の混在はなかった。

3. 群分け法

雌雄とも初回投与日の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けし、 1 群あたりに各13匹を用意した。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

m-NAの投与量は、次項に示す予備試験の結果を参考に、5, 15 および 50 mg/kg とした。投与液量は、各用量とも 5 ml/kg とし、対照群のラットには、懸濁用媒体である 0.5%-CMC Na水溶液をm-NA投与群と同一条件にて投与した。以下に群構成を示す。

#¥ ≖⊊ □	ትት፱ዾዩሎፑና	北	排 严 洗 團	匹数(動	物番号)
群番号	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与液量 (ml/kg)	雄	堆
1 2 3	溶媒対照 a m-NA m-NA	0 5 15	5 5 5	13 (MX01001-013) 13 (MX02001-013) 13 (MX03001-013)	13 (FB01001-013) 13 (FB02001-013) 13 (FB03001-013)
4	m-NA	50	5 5	13 (MX04001-013)	13 (FB04001-013)

a: 0.5% CMC-Na 水溶液

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後14日間の連続 42 日間、また、雌に対しては交配前14日間と交配期間中(交尾成立まで;最長14日間)ならびに交尾成立雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日まで毎日1回、ラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。毎日の投与は、原則として一定時刻の間(通常13時~16時)に行い、各動物の投与液量は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重をもとに、ま

た、交尾成立後の雌については妊娠()日の体重をもとにそれぞれ算出した。

5. 予備試験(投与量の設定)

簡易生殖毒性試験の投与量を設定する目的で、m-NAの 0 (溶媒対照), 25, 50 および 100 mg/kgを Sprague Dawley 系 (Crj:CD) ラットの雌雄各 5 匹に交配前 7 日間と交配期間中 (最長 7 日) を通して経口投与し、交尾の成否を検討した。また、交尾成立雌についてはさらに妊娠12日まで投与を継続し、受胎能力および胚の生存性に対する影響について検討した。親動物については、生死、一般状態を毎日観察し、体重を投与開始日、交配開始日、妊娠 0, 7 および13日に測定した。摂餌量については、投与開始日から交配開始日までの 7 日間の総摂取量を求めた。雄と未交尾の雌は、交配期間終了日(14回投与)の翌日に剖検し、雄については精巣と精巣上体重量を測定した。交尾成立雌は妊娠13日に剖検し、妊娠黄体数および着床数を数え、胚の生死を調べた。試験材料および方法は、簡易生殖毒性試験に準じた。なお、m-NAの用量は、 15, 50 および 170 mg/kgを用いて行われた「F344ラットにおける m-nitroaniline の28日間反復経口投与毒性試験」1 の結果を参照して設定した。この反復投与毒性試験では、 15 mg/kg 以上の投与で赤血球数、ヘモクロヒン量および ヘマトクリット値の減少が雌雄に、また、 50 mg/kg 以上の投与で精巣および精巣上体の萎縮がそれぞれ用量依存的に認められている。

試験結果は、次のように要約される。

(1) 雄動物所見

i)一般状態

死亡例は、いずれの投与群においても認められなかった。一般状態に関しては、100 mg/kg 投与群の全例で投与10~14日(投与開始日=投与0日、投与14日=剖検日)に末端部体表の褪色がみられたが、この他には、いずれの投与群においても被

験物質の投与に起因したと推定される一般状態の変化は認められなかった。

ii) 体重および摂餌量 (Tables P1~P3, Appendixes P1-1~P3-4)

体重、体重増加量、摂餌量ともに対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

iii) 剖検所見、精巣および精巣上体重量 (Table P4, Appendixes P4-1~P4-4) 脾の腫大あるいは暗色化が、100 mg/kg 投与群の5例全例および 50 mg/kg 投与群の5例中4例にみられたほか、精巣および精巣上体の萎縮が、100 mg/kg 投与群の2例および 50 mg/kg 投与群の1例にみられた。しかし、精巣および精巣上体の重量には、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

(2) 雌動物所見

i) 一般状態

死亡例は、いずれの投与群においても認められなかった。一般状態に関しては、100 mg/kg 投与群の全例および 50 mg/kg 投与群の5例中4例で投与10~18日の間に未端部体表の褪色がみられた。

ii) 体重 (交配前: Table P5,P6, Appendixes P5-1~P6-4, 妊娠期間中: Table P7, P8, Appendixes P7-1 ~P8-4) および摂餌量 (Table P9, Appendixes P9-1~P9-4)

体重、体重増加量にはいずれの測定時期においても対照群と被験物質投与群との 間で有意差は認められなかった。摂餌量が、100 mg/kg 投与群において有意な低値を 示した。

iii) 剖検所見

各被験物質投与群ともすべての雌で脾の腫大あるいは暗色化が認められた。

- (3) 交配成績 (Table P10, Appendixes P10-1 ~P10-4)
 - 50 mg/kg 以上の投与群では、各5組の交配においてそれぞれ2組が未交尾であ

った。 25 mg/kg 投与群および対照群では、すべての組合せにおいて交尾が成立した。しかし、妊娠成立雌は、対照群で1例、 25 mg/kg 投与群で3例、 50 および 100 mg/kg 投与群で各2例得られたにすぎなかった。なお、未交尾の雄では、精巣および精巣上体の萎縮が、100 mg/kg 投与群で2例全例、 50 mg/kg 投与群で2例中1例にみられた。

(4) 妊娠13日帝王切開所見 (Table P11, Appendixes P11-1 ~P11-4)

妊娠黄体数、着床数、着床率および胚死亡率に被験物質の投与に起因したと推定 される変化は認められなかった。

(5) 簡易生殖毒性試験における投与量

簡易生殖毒性試験では、より長い投与期間 (2週間) を交配前に設定することから、100 mg/kg/day の投与では、雄に精巣毒性が強く発現し、次世代児への影響を評価するに必要な数の妊娠成立雌が得られない可能性が考えられた。このことから簡易生殖毒性試験では、最高用量を 50 mg/kg/day とし、以下を公比約3で除して15 および5 mg/kg/day の各用量を設定した。

6. 観察方法

1) 親動物

(1)一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

(2)体重

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週1回(雄:投与0,7,14,21,28,35,41日、雌:投与0,7,14,21日(投与0日=投与開始日)) および解剖日に

測定した。また、交尾成立雌では、妊娠 0,7,14,21 日、分娩した雌では、分娩後1および 4日 (哺育1および 4日) の体重を測定した。

(3) 摂餌量

雌雄とも、全例について体重測定日と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算定した。交配期間中の摂餌量は測定しなかった。交尾成立雌では、妊娠 0-7, 7-14, 14-20 日および分娩した雌では、哺育 1-4日の摂餌量を測定した。

(4) 交配

交配は、投与14日(15回投与日)の夕方から最長2週間、同一群内の雌雄を1対 1で終日同居させて行った。交尾成立の確認は、毎朝、腟内の腟栓あるいは腟垢中 の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日 と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率 [(交尾動物数/同居動物数)×100]、受胎率[(妊娠動物数/交尾動物数)×100] および同居開始日から交尾確認日までの日数を求めた。なお、2週間の交配期間中 に交尾を示さなかった雌雄(未交尾雄および雌)は、交配期間終了日(投与28日相 当日)に剖検した。

(5)分娩状態

各群とも交尾成立雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の直接観察は、可能な ものについて行った。ただし、直接観察できなかった個体についても、分娩後の徴 候から分娩困難や分娩遅延などの分娩障害の有無を判断し、個別に記録した。

(6)分娩日の算定

分娩の確認は、午前9時~11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体について、その日を哺育1日、その前日を分娩日(哺育0日)と規定した。午前11時を過ぎて分娩した個体については、翌日を哺育1日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠 0 日~分娩日の日数)を算定した。 また、出産率 [(生児出産雌数/妊娠雌数)× 100]を求めた。

(7)剖検

a) 雄動物

未交尾雄は交配期間終了日に、交尾成立雄は全例を42回投与の翌日(投与42日) にエーテル深麻酔下で放血・致死させ、剖検した。また、全例について精巣および 精巣上体を摘出し、重量を測定した。精巣および精巣上体は、ブアン液に固定して 保存し、50 mg/kg 投与群および対照群の全例について病理組織学的検査を行った。 剖検において異常を認めた器官は 10%ホルマリンに固定して保存した。

b) 雌動物

分娩した雌は哺育4日に、交尾したが分娩しない雌は妊娠25日相当日に、また、 未交尾雌は交配期間終了日にそれぞれエーテル深麻酔下で放血・致死させ、剖検し た。妊・不妊および未交尾のいずれの例においても卵巣および子宮は、摘出し、子 宮については Salewski 法30 を応用して着床痕を染色して着床数を確認した。卵巣 はブアン液に固定して保存し、実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えたほか、交尾した が不妊であった雌および未交尾雌について病理組織学的検査を行った。剖検におい て異常を認めた器官および子宮は 10%ホルマリンに固定して保存した。

2) 出生児

(1)産児数の算定

哺育1日に産児数(生存児+死亡児)を調べ、児の産出率 [(産児数/着床痕数)×100]および出生率 [(出産生児数/着床痕数)×100]を求めた。産児の性別を調べ、外表異常の有無を観察した。

(2)死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、哺育1日の生存率 [(生児数/産児数)×100] および哺育4日の生存率 [(哺育4日の生児数/哺育1日の生児数)×100] を求めた。死亡児は剖検し、胸腔および腹腔内の器官を除去した後、エタノールに固定して保存した。

(3)体重測定

哺育1日および4日に一腹単位で雌雄別に体重(litter重量)を測定し、[litter重量/測定児数]を各腹について求めた。

(4) 剖検

哺育4日に全例をエーテル深麻酔下で致死させ、剖検した。胸腔および腹腔内の器官は、一括して摘出し、各腹ごとに 10%ホルマリンに固定して保存した。カーカスは、各腹ごとにエタノールに固定して保存した。

(5) 骨格観察

50 mg/kg 投与群および対照群について哺育4日に剖検した児の全例および観察可能な死亡児を Dawson 法4 により骨格標本とし、骨格異常および変異の有無を調べた。なお、死亡児については、対照群には異常、変異ともにみられず 50 mg/kg

投与群においてのみ骨格変異がみられたことから観察の対象を全群に広げ、すべて の観察可能な死亡児について骨格観察を行った。

7. 動物の個体識別法

試験に使用した動物には、F₁ 出生児を除き、すべて尾にフェルトペンで群および個体番号を記して個体識別した。各飼育ケージには、個体番号等の必要事項を記入した、群ごとに色彩の異なるカードを掛けて個体識別の補助とした。F₁ 出生児は、個体を識別しなかった。

8. 統計処理

交尾率および受胎率については x² 検定を行った。その他のすべてのデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を 1 標本として、先ず、Bartlett 法により各群の分散の一様性について検定した。その結果、分散が一様とされた場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合には Dunnett法あるいは Scheffé法により対照群と各被験物質投与群との間で平均値の差の検定を行った。分散が一様でなかった場合は、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意性が認められた場合に対照群と各被験物質投与群との差について Dunnett型あるいは Scheffé型の検定を行った。

有意水準は、5%および1%とした。

I. 反復投与毒性

1. 雄動物

(1)途中死亡例

死亡例は、対照群を含むいずれの投与群においても認められなかった。

(2)一般状態

50 mg/kg 投与群の1例 (MX04002)において末端部体表の褪色が、投与36日 (37 回投与日)から剖検日にかけて認められた。このほかには、5 mg/kg 投与群の1例 (MX02013)で、立毛、眼周囲の褐色汚れ、糞の小粒化が、投与7日から11日 (8回 ~12回投与日)にかけて一時的にみられたが、他の投与群に類似の変化は認められなかった。

(3)体重

1)体重 (実測値、Table 1; Appendixes 1-1~1-4)

いずれの測定時期においても対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

- 2) 增加量 (Table 2; Appendixes 2-1~2-4)
- 50 mg/kg 投与群において投与開始~投与第1週の増加量が有意(p<0.05)な低値を示した。 15 mg/kg 投与群では投与第3~4週の増加量が有意(p<0.05)な低値を示したが、用量依存的な変化ではなかった。5 mg/kg 投与群の増加量にはいずれの測定時期においても対照群と比較して有意差は認められなかった。

(4) 摂餌量 (Tables 3,4; Appendixes 3-1~4-4)

50 mg/kg 投与群において投与第1週の摂餌量が、有意 (p<0.05) な低値を示した。 15 mg/kg 以下の投与群の摂餌量には、被験物質の投与に起因したと推定される変化は認められなかった。

(5) 剖検所見 (Table 15)

50 mg/kg 投与群の13例中3例に肝の腫大および 50 mg/kg 投与群の13例全例ならびに 15 mg/kg 投与群の13例中3例に脾の腫大あるいは暗色化がみられたほかには、被験物質投与に起因すると推定される変化はみられなかった。

(6)精巣および精巣上体重量 (Table 5; Appendixes 5-1~5-4)

精巣および精巣上体の重量には、被験物質の投与に起因したと推定される変化は 認められなかった。

(7)精巣および精巣上体の病理組織学的所見

対照群と 50 mg/kg 投与群の全例について観察した結果、被験物質の影響を示唆 する異常所見は、いずれの例にもみられなかった。

2. 雌動物

(1)途中死亡例

50 mg/kg 投与群において1例 (FB04013)が、妊娠23日に産児2匹を娩出したまま分娩途中で死亡した。本例の死亡直前の一般状態あるいは分娩状態は観察できなかったが、外表に異常はみられず、また死亡前日までの一般状態にもなんら変化はみられなかった。剖検においては、胸腺の赤色化、肺の浮腫様変化と同辺縁部の赤色化、内容物に乏しい消化管、腸間膜リンパ節および脾の暗色化、胃底部粘膜の潰

瘍および糜爛がみられたが、死因は特定できなかった。なお、本例の黄体数および 着床数はともに右側12、左側6であり、剖検において右子宮角内に12匹、左子宮角 内に4匹の末期胎児を確認した。

(2)一般状態

50 mg/kg 投与群の1例 (FB04009)で妊娠期間の後半に末端部体表の褪色がみられた他には、いずれの雌にも被験物質投与に起因したと推定される変化はみられなかった。

(3)体重 (Tables 6~11; Appendixes 6-1~11-4)

50 mg/kg 投与群の体重は、投与開始後一貫して低値に推移した。しかし、交配前、妊娠期間中および分娩後のいずれの測定時期においても、雌の体重および増加量には、対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

(4) 摂餌量 (Tables 12~14; Appendixes 12-1~14-4)

交配前において 50 mg/kg 投与群の投与第1週の摂餌量が有意な低値を示した (Table 12)。妊娠期間中 (Table 13) および分娩後 (Table 14) の摂餌量には対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

(5) 剖検所見 (Table 16)

試験を完了し、哺育4日に剖検した雌では 50 mg/kg 投与群の9例中8例および 15 mg/kg 投与群の10例中1例に、不妊および全児死亡の雌においては 50 mg/kg 投与群の全児死亡例 3 例中1 例に脾の腫大あるいは暗色化がみられた。また、哺育4日に剖検した雌において 50 mg/kg 投与群の9 例中5 例および5 mg/kg 投与群の 13例中1 例に肝の腫大がみられたが、同様の変化は 15 mg/kg 投与群の雌では認め

られなかった。このほかには、**被験物質投与**に起因すると推定される変化はみられなかった。

(6) 卵巣の病理組織学的所見

50 mg/kg 投与群の死亡例1例、全児死亡例3例および 15 mg/kg 投与群の不妊例1例、全児死亡例2例について観察した結果、被験物質の影響を示唆する異常所見はいずれの例にもみられなかった。

Ⅱ. 生殖・発生毒性

1. 交配成績 (Table 17; Appendixes 17-1~17-4)

交尾は、各群ともすべての組合せにおいて成立し、さらに 15 mg/kg 投与群の不 妊1例を除いては、全ての雌で妊娠が成立した。同居開始から交尾にいたるまでの 平均日数にも対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。また、 すべての雌が同居開始後の最初の発情期において交尾を成立させた。

2. 黄体数、着床数、着床率 (Table 18; Appendixes 18-1~18-4)

妊娠雌の黄体数、着床数および着床率に対照群と被験物質投与群との間で有意差 は認められなかった。

3. 出産率および妊娠期間 (Table 18; Appendixes 18-1~18-4)

出産率は、各群とも 100% を示した。また、分娩雌の妊娠期間に対照群と被験物 質投与群との間で有意差は認められなかった。

4. 分娩状態

直接観察において分娩の異常を認めた例は、いずれの投与群においてもなか

った。しかし、哺育1日 (分娩後、最初の観察日) に 50 mg/kg 投与群の2例 (FB04010, FB04011) および 15 mg/kg 投与群の1例 (FB03006)では、陰部または 腹部体表に血様の汚れがみられ、分娩になんらかの異常があったことが推測された。

5. 哺育状態

分娩の異常が推定された 50 mg/kg 投与群の2例および 15 mg/kg 投与群の1例では、いずれも哺育1日中に、また、妊娠期間の後半に末端部体表の褪色を呈した 50 mg/kg 投与群の1例では哺育3日までにそれぞれの産児全例が死亡した。このほかには 15 mg/kg 投与群の1例 (FB03010)で哺育2日までに全産児の死亡が確認されたが、他の雌の哺育状態にはいずれの投与群においても異常は認められなかった。

6. 出生児所見

1) 生存性 (Table 18; Appendixes 18-1~18-4)

15 および 50 mg/kg 投与群では、哺育1日の全児死亡がそれぞれ1および2例 存在したことにより、児の産出率および出生率が低値を示したが、有意な変化ではなかった。哺育1日の産児数、生児数、生存率ならびに哺育4日の生児数および生存率にも対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 体重 (Table 19; Appendixes 19-1~19-4)

出生児の体重には、哺育1および4日のいずれにおいても雌雄ともに対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

3) 剖検所見 (哺育4日)

a. 外表所見 (Table 20; Appendixes 20-1~20-4)

対照群の出生児1例(母動物; FB01005)に鎖肛および尾欠損がみられた他には、いずれの出生児においても外表異常は観察されなかった。なお、出生日の外表観察においても同様の所見が得られたほかには異常は認められなかった。

b. 内臓所見 (Table 21; Appendixes 21-1~21-4)

内臓異常については、5 mg/kg 投与群の出生児1例(母動物; FB02010)に横隔膜 ヘルニアが、また、内臓変異については、対照群の1例に腎盂拡張がみられたが、15および 50 mg/kg 投与群の出生児には、内臓異常、変異ともに認められなかった。

c. 骨格所見 (Table 22; Appendixes 22-1~22-4)

骨格異常としては、 50 mg/kg 投与群の 2 例 (母動物; FB04005, FB04012)に胸骨分節癒合、対照群の 1 例 (外表異常個体, 母動物; FB01005)に仙・尾椎欠損、 1 例 (母動物; FB01011)に肋骨欠損、 1 例 (母動物; FB01011、同腹児)に胸椎椎体・椎弓欠損がみられた。骨格変異については、頸肋骨、腰椎数変異、腰肋骨が 50 mg/kg 投与群と対照群で、過剰胸骨分節が対照群で、13肋骨短小が 50 mg/kg 投与群でそれぞれ低率に観察された。しかし、骨格異常および変異ともに発生頻度には、対照群と 50 mg/kg 投与群との間で有意差は認められず、また、特定の型の異常あるいは変異が、 50 mg/kg 投与群において増加する傾向も認められなかった。

4) 死亡児の剖検所見 (Table 23)

骨格変異として頸肋骨、ダンベル型胸椎椎体および腰椎数変異が各被験物質投与 群に散見された他には、いずれの投与群の死亡児においても外表異常、内臓異常、 内臓変異および骨格異常は認められなかった。

以上の試験成績から、m-NAの 15 mg/kg 以上 50 mg/kg 以下の量は、ほぼ 6 週間 の連続投与により、雌雄ラットに脾の腫大あるいは暗色化を来す毒性発現量であり、 一部の雌に対しては、その分娩あるいは哺育機能に障害を及ぼして全児死亡を招く 可能性が示唆される。また、 50 mg/kg は、雌雄ラットに体重増加の抑制あるいは 摂餌量の減少を来し、さらに分娩途中の雌1例が死亡したことから、本化合物の妊 振ラットに対する最大耐量を若干凌駕した量と考えられる。m-NAのラットに及ぼす 毒性については、F344ラットにおいて 15 mg/kg 以上の反復投与により、用量依存 的に赤血球数の減少を来し、脾については腫大、赤脾髄の褐色色素沈着、髄外造血 の亢進および鬱血を惹起することが報告されている1)。本試験において雌雄ラット にみられた脾の腫大あるいは暗色化は、同様の変化が SD ラットにおいても生起し ていたことを示唆しており、一般状態の観察において 50 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例にみられた末端部体表の褪色は、亢進した貧血状態を反映した所見である可能性 が高い。一方、この様な一般状態あるいは分娩状態の変化を呈さなかった雌ラット においては、 50 mg/kg 投与群においてもその出生児の発生・発育および生存性に 変化はみられず、少なくともm-NAの 50 mg/kg 以下の量には次世代児に対する直接 的な毒性は認められなかった。また、出生児の形態についても、死亡児を含めて被 験物質投与に起因したと考えられる異常はみられなかったことから催奇形作用も認 められなかった。なお、本化合物については雄ラットに対する精巣毒性が知られて おり、予備試験においては 50 mg/kg の 2 週間の投与で 5 例中 1 例に精巣および精 巣上体の萎縮が発現した。しかし、本試験においては雌雄ラットの交尾および受胎 能力にはなんら影響はみられず、精巣および精巣上体の病理組織学的検査において も異常は認められなかった。従って、m-NAの 50 mg/kg は、精巣毒性の発現に関す る臨界量に近接した量とも考えられる。本実験条件下では、m-NAの雌雄ラットに対

する反復投与毒性に関する無影響量および雌ラットの生殖能力に対する無影響量は 5 mg/kg、雄ラットの生殖能力に対する無影響量および次世代児に対する無影響量 は 50 mg/kg と判断される。

文 献

- 1) : F344ラットにおける m-nitroaniline の28日間反復経口投 与毒性試験. 既存化学物質安全性スクリーニンク 試験報告書, 国立衛生試験所・病 理部. (1991)
- 2) 河合昭宏 他: 脂肪族および芳香族ニトロ化合物の変異原性-工業材料およびその関連物質. 産業医学, 29: 34-54 (1987)
- 3) Salewski, E.: Färbemethode zum makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 247: 367 (1964)
- 4) Dawson, A. B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain Technol. 1: 123-124 (1926)

文	献			·		 	2	4
Inde Tabl	ex les	¢	}		·································	 	別	⊞

INDEX (Tables)

Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats

Table P1	Body weights of F _o males in the treatment period (g); Mean \pm S.D. (N)
Table P2	Body weight gain data of F_0 males in the treatment period (g); Mean \pm S.D. (N)
Table P3	Food consumption of F $_{0}$ males in the treatment period (g) ; Mean \pm S.D. (N)
Table P4	Absolute and relative organ weights of F_0 males; Mean $\pm S.D.$ (N)
Table P5	Body weights of Fo females in the pre-mating period (g); Mean \pm S.D. (N)
Table P6	Body weight gain data of F0 females in the pre-mating period (g); Mean \pm S.D. (N)
Table P7	Body weights of F ₀ females in the pregnant period (g); Mean \pm S.D. (N)
Table P8	Body weight gain data of F_0 females in the pregnant period (g); Mean \pm S.D. (N)
Table P9	Food consumption of Fo females in the pre-mating period (g); Mean \pm S.D. (N)
Table P10	Summary of reproductive performance
Table P11	Summary of reproduction data

Table P1 Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats Body weights of F₀ males in the treatment period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine 3-Nitrobenzenamine		
Dose groups (mg/kg)	0	25	50	100	
Treatmant Week					
0 (Init. wt.)	253.0 ± 7.9 (5)	253.0 ± 6.6 (5)	255.8 ± 8.5 (5)	251.4 ± 8.0 (5)	
1	304.1 ± 15.0 (5)	300.4 ± 11.2 (5)	302.7 ± 12.1 (5)	295.9 ± 10.2 (5)	
2	342.1 ± 13.1 (5)	336.7 ± 13.9 (5)	336.9 ± 13.5 (5)	333.8 ± 9.9 (5)	

Table P2 Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats Body weight gain data of F_0 males in the treatment period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine		
Dose groups (mg/kg)	0	25	50	100		
Treatment Week						
0~1	51.0 ± 8.3 (5	5) 47.4 ± 12.5 (5)	46.9 ± 7.1 (5)	44.5 ± 4.4 (5)		
1~2	38.0 ± 6.8 (5	36.3 ± 4.4 (5)	34.1 ± 6.7 (5)	37.9 ± 7.2 (5)		

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	25	50	100
Treatment Week				
1	188.5 ± 13.8^{a} (5)	170.8 ± 15.7 (5)	174.7 ± 12.4 (5)	167.8 ± 12.2 (5)

a) Total consumption for a week

Table P4 Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats Absolute and relative organ weights of Fo males; Mean \pm S.D. (N)

Compounds		Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)		0	25	50	100
Final body weight	(g)	342.1 ± 13.1 (5) 336.7 ± 13.9 (5) 336.9 ± 13.5 (5) 333.8 ± 9.9 (5)
Testis	(g)	2.85 ± 0.19^{a} (0.83 ± 0.07^{b}	5) 2.82 ± 0.13 (0.84 ± 0.07	5) 2.73 ± 0.38 (0.81 ± 0.10	5) 2.93 ± 0.22 (5) 0.88 ± 0.07
Epididymis	· (g)	0.60 ± 0.05 (0.18 ± 0.02	5) 0.69 ± 0.07 (0.21 ± 0.03	5) 0.63 ± 0.20 (0.19 ± 0.06	5) 0.63 ± 0.05 (5) 0.19 ± 0.01

a): Absolute weight
b): Relative weight(g per 100g body weight)
Vehicle control: 0.5% CMC-Na solution

Table P5 Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats Body weights of Fo females in the pre-mating period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine		
Dose groups (mg/kg)	0	25	50	100		
Pre-mating Week						
0 (Init. wt.)	201.7 ± 13.5 (5)	201.3 ± 9.0 (5)	200.8 ± 10.6 (5)	200.1 ± 10.0 (5)		
1-1	221.0 ± 8.6 (5)	221.8 ± 13.4 (5)	218.7 ± 11.6 (5)	212.0 ± 8.6 (5)		

Table P6 Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats Body weight gain data of Fo females in the pre-mating period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	
Dose groups (mg/kg)	0	25	50		
Pre-mating Week					
0~1	19.3 ± 8.8 (5) 20.5 ± 7.3 (5	5) 18.0 ± 2.5 (5	3) 11.9 ± 3.6 (5)	

Table P7
Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats
Body weights of Fo females in the pregnant period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control		1	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrol	benzenamine	3-Nitrobenzenamine		
Dose groups (mg/kg)	PS 0			25	50) `			
Pregnant Day									
0	246.0	(1)	$226.8 \pm 7.9 (3)$	227.8	(2)	225.0	(2)	
7	293.9	(1)	$261.7 \pm 13.9 (3)$	266.5	(2)	254.4	(2)	
13	327.0	(1)	$297.0 \pm 21.2 (3)$	288.2	(2)	287.1	(2)	

Table P8

Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats

Body weight gain data of Fo females in the pregnant period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds -	Vehicle	control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrob	enzenamine	3-Nitrol	benzenamine
ose groups (mg/kg)	0		25	5	0 .	10	00
regnant Day							
0~7	47.9	(1)	$34.9 \pm 6.5 (3)$	38.7	(2)	29.4	(2)
7∼13	33.1	(1)	35.3 ± 10.5 (3)	21.8	(2)	32.7	(2)

Table P9 Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats Food consumption of F $_{0}$ females in the pre-mating period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	25	50	100
Pre-mating Week				
1	143.0 ± 14.4 ^a)(5)	138.6 ± 11.7 (5)	126.4 ± 9.5 (5)	115.4 ± 6.4** (5

Vehicle control: 0.5% CMC-Na solution
**:Significant difference from control, p<0.01

a) Total consumption for a week

Table P10

Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats

Summary of reproductive performance

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	25	50	100
No. of animals examined (A)				
Male	5	5	5	5
Female	5	5	5	5
No. of animals copulated (B)	5	5	3	3
Copulation index [(B/A)×100] (%)	100.0	100.0	60.0	60.0
No. of animals conceived (C)	1	3	2	2
Fertility index [(C/B)×100] (%)	20.0	60.0	66.7	66.7
Mean pairing days until copulation (Mean±S.D.)	3.8.±2.8	2.8±1.1	2.7±2.9	2.7±1.5

Table P11 Dose range finding study for 3-Nitrobenzenamine in rats Summary of reproduction data

Compounds Dose groups (mg/kg)	Vehicle control 0	3-Nitrobenzenamine 25	3-Nitrobenzenamine 50	3-Nitrobenzenamine 100
Pregnant animals	1	3	2	2
Corpora lutea ; Total Mean±S.D.	19 19.0	49 16.3 ± 1.5	24 12.0	37 18.5
Implantations ; Total Mean±S.D.	18 18.0	$\begin{array}{c} 37 \\ 12.3 \pm 7.2 \end{array}$	6 3.0	25 12.5
Implantation rate a) Mean±S.D.	94.7	73.7 ±40.8	25.2	71.5
Intrauterine deaths Total; Mean±S.D. Resorbed Total; Mean±S.D. Placental remnants Macerated fetuses Total; Mean±S.D.	2; 2.0	$\begin{array}{c} 1 \ ; 0.3 \ \pm \ 0.6 \\ 0 \ ; 0.0 \ \pm \ 0.0 \\ 1 \ ; 0.3 \ \pm \ 0.6 \\ 0 \ ; 0.0 \ \pm \ 0.0 \end{array}$	1; 0.5 0; 0.0 0; 0.0 1; 0.5	1; 0.5 0; 0.0 1; 0.5 0; 0.0
Intrauterine mortality b) Mean±S.D.	11.1	2.0 ± 3.4	16.7	5.6
Live fetuses Total Mean±S.D.	16 16.0	36 12.0 ± 6.9	5 2.5	24 12.0

a): Implantation rate = (No. of implants in each dam / No. of corpora lutea in each dam) \times 100 b): Intrauterine mortality = (No. of deaths in each dam / No. of implants in each dam) \times 100

INDEX (Tables)

Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats

```
Table 1
            Body weights of F_0 males in the treatment period(g); Mean \pm S.D. (N)
Table 2
            Body weight gain data of F_0 males in the treatment period(g); Mean \pm S.D. (N)
Table 3
            Food consumption of F_0 males in the pre-mating period (g) ; Mean \pm S.D. (N)
Table 4
            Food consumption of F_0 males in the post-mating period (g); Mean \pmS.D. (N)
            Absolute and relative organ weights of F_0 males; Mean\pm S.D. (N)
Table 5
Table 6
            Body weights of Fo females in the pre-mating period (g); Mean±S.D. (N)
Table 7
            Body weight gain data of F_o females in the pre-mating period (g); Mean\pmS.D. (N)
Table 8
            Body weights of Fo females in the pregnant period (g); Mean±S.D. (N)
Table 9
            Body weight gain data of F_0 females in the pregnant period (g); Mean\pmS.D. (N)
Table 10
            Body weights of F_0 females in the lactation period (g); Mean\pmS.D. (N)
Table 11
            Body weight gain data of F_o females in the lactation period (g); Mean\pmS.D. (N)
Table 12
            Food consumption of Fo females in the pre-mating period (g); Mean±S.D. (N)
Table 13
            Food consumption of F<sub>0</sub> females in the pregnant period (g); Mean±S.D. (N)
            Food consumption of F_0 females in the lactation period (g); Mean \pm S.D. (N)
Table 14
Table 15
            Summary of autopsy findings in Fo males (macroscopic)
Table 16
            Summary of autopsy findings in Fo females (macroscopic)
Table 17
            Summary of reproductive performance
Table 18
            Summary of development of F<sub>1</sub> pups up to day 4 of lactation
Table 19
            Body weights of F, pups up to day 4 of lactation; Mean ± S.D. (N)
Table 20
            Summary of external observation of the pups
            Summary of visceral observation of the pups
Table 21
Table 22
            Summary of skeltal observation of the pups
```

Summary of morphological observation of F₁ dead pups

Table 23

Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats

Body weights of F. males in the treatment period (g); Hean±S.D. (N)

compounds 	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	
ose groups (mg/kg)	0	5	15	50	
realment Week					
0 (Init. wt.)	299.0 ± 10.6 (13)	300.4 ± 12.0 (12)	298.7 ± 12.4 (13)	298.4 ± 9.9 (13)	
1	340.1 ± 14.4 (13)	340.7 ± 19.0 (12)	335.1 ± 16.6 (13)	330.1 ± 12.9 (13)	
2	377.2 ± 23.1 (13)	383.1 ± 20.3 (12)	371.7 ± 21.6 (13)	365.9 ± 18.4 (13)	
3	406.9 ± 27.5 (13)	420.4 ± 22.2 (12)	400.8 ± 25.6 (13)	391.5 ± 18.4 (13)	
4	440.0 ± 32.4 (13)	456.0 ± 24.4 (12)	428.1 ± 28.8 (13)	420.7 ± 19.2 (13)	
5	468.1 ± 36.2 (13)	486.9 ± 25.6 (12)	449.5 ± 33.0 (13)	445.0 ± 22.1 (13)	
6	491.3 ± 43.5 (13)	510.5 ± 31.2 (12)	468.1 ± 40.1 (13)	460.8 ± 24.6 (13)	

Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats

Body weight gain data of F. males in the treatment period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	. 0	5	15	50
Freatment Week				
0~1	41.1 ± 8.4 (13	40.3 ± 16.2 (12)	36.4 ± 6.8 (13)	31.7 ± 8.2* (13)
1~2	37.0 ± 10.1 (13	42.4 ± 8.1 (12)	36.6 ± 6.9 (13)	35.8 ± 7.3 (13)
2~3	29.8 ± 6.2 (13	37.3 ± 9.4 (12)	29.1 ± 5.6 (13)	25.6 ± 4.0 (13)
3~4	33.1 ± 5.8 (13	35.6 ± 6.5 (12)	27.3 ± 5.8* (13)	29.2 ± 4.2 (13)
4~5	28.1 ± 7.0 (13	30.8 ± 9.0 (12)	21.3 ± 6.1 (13)	24.3 ± 6.1 (13)
5 ~ 6	23.2 ± 8.5 (13) 23.6 ± 7.9 (12)	18.6 ± 9.2 (13)	15.8 ± 7.8 (13)

Vehicle control: 0.5% CMC-Na solution
* :Significant difference from control, p<0.05

Table 3 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Food consumption of F. males in the pre-mating period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Oose groups (mg/kg)	0	5	15	50
reatment Week				
1	$195.8 \pm 15.4a$)(13)	195.5 ± 21.5 (12)	188.5 ± 15.1 (13)	165.4 ± 13.3** (13
2	194.4 ± 17.6 (13)	200.6 ± 15.1 (12)	193.0 ± 11.9 (13)	184.9 ± 15.0 (13)

Vehicle control: 0.5% CMC-Na solution
**:Significant difference from control, p<0.01

a) The total consumption for a week

Table 4 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Food consumption of F_o males in the post-mating period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
Treatment Week				
5	202.3 ± 21.7^{a} (13)	218.4 ± 18.1 (12)	200.7 ± 14.8 (13)	195.4 ± 15.6 (13)
6	203.6 ± 24.7 (13)	219.8 ± 22.7 (12)	202.0 ± 20.5 (13)	195.8 ± 16.3 (13)

a) The total consumption for a week

Table 5 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Absolute and relative organ weights of F. males; Mean ± S.D. (N)

Compounds		Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	-	0	5	15	50
Final body weight	(g)	491.3 ± 43.5 (3) 510.5 ± 31.2 (1	2) 468.1 ± 40.1 (13) 460.8 ± 24.6 (13)
Testis	(g)	3.23 ± 0.31^{a} (: 0.66 ± 0.07 ^b)	3.27 ± 0.19 (1 0.64 ± 0.04	2) 3.21 ± 0.27 (0.69 ± 0.06	13) 3.17 \pm 0.24 (13) 0.69 \pm 0.05
Epididymis	(g)	1.15 ± 0.12 (: 0.23 ± 0.03	1.13 ± 0.08 (1 0.22 ± 0.02	2) 1.12 ± 0.09 (0.24 ± 0.03	13) 1.10 ± 0.08 (13) 0.24 ± 0.01

a): Absolute weight
b): Relative weight(g per 100g body weight)
Vehicle control: 0.5% CMC-Na solution

Table 6 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Body weights of F. females in the pre-mating period (g); Mean \pm S.D. (N)

Vehicle control	ontrol 3-Nitrobenzenamine 3-Nitro		3-Nitrobenzenamine	
0	.5	15	50	
	·.			
210.0 ± 11.2 (13)	209.5 ± 11.0 (13)	210.2 ± 12.1 (13)	210.8 ± 13.8 (13)	
231.5 ± 16.6 (13)	229.5 ± 14.5 (13)	228.7 ± 19.8 (13)	225.1 ± 15.8 (13)	
249.3 ± 16.8 (13)	246.0 ± 14.8 (13)	245.3 ± 17.9 (13)	240.6 ± 19.3 (13)	
	0 210.0 ± 11.2 (13) 231.5 ± 16.6 (13)	0 5 210.0 ± 11.2 (13) 209.5 ± 11.0 (13) 231.5 ± 16.6 (13) 229.5 ± 14.5 (13)	0 5 15 210.0 ± 11.2 (13) 209.5 ± 11.0 (13) 210.2 ± 12.1 (13) 231.5 ± 16.6 (13) 229.5 ± 14.5 (13) 228.7 ± 19.8 (13)	

Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats

Body weight gain data of Fo females in the pre-mating period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
Pre-mating Week				
0~1	21.5 ± 8.6 (1	3) 20.0 ± 7.2 (13)	18.5 ± 9.8 (13	14.3 ± 4.7 (13)
1~2	17.8 ± 6.7 (1	3) 16.5 ± 2.9 (13)	16.6 ± 8.0 (13	15.5 ± 6.2 (13)

Table 8 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Body weights of F. females in the pregnant period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50	
Pregnant Day					
0	256.9 ± 16.0 (13)	252.8 ± 17.3 (13)	251.9 ± 19.6 (12)	246.3 ± 20.5 (13)	
7	297.6 ± 21.3 (13)	291.3 ± 21.2 (13)	290.2 ± 21.5 (12)	285.4 ± 26.0 (13)	
14	337.2 ± 24.7 (13)	328.9 ± 26.2 (13)	330.6 ± 27.2 (12)	319.6 ± 29.0 (13)	
20	412.0 ± 27.8 (13)	408.6 ± 31.0 (13)	406.4 ± 25.2 (12)	388.3 ± 31.1 (13)	

Table 9 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Body weight gain data of F_0 females in the pregnant period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
Pregnant Day				
0~7	40.7 ± 9.1 (13	38.5 ± 8.8 (13)	38.2 ± 10.7 (12	39.1 ± 12.2 (13)
7~14	39.6 ± 6.5 (13	37.6 ± 8.9 (13)	40.4 ± 7.5 (12	34.2 ± 6.2 (13)
14~20	74.8 ± 7.6 (13) 79.7 ± 10.4 (13)	75.9 ± 9.0 (12) 68.7 ± 13.9 (13)

Table 10 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Body weights of F. females in the lactation period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
Post partum Day				
1	293.6 ± 25.3 (13)	299.2 ± 31.4 (13)	290.3 ± 42.7 (12)	279.1 ± 40.6 (12)
4	321.1 ± 23.3 (13)	313.3 ± 21.9 (13)	310.9 ± 36.3 (10)	318.7 ± 25.8 (9)

Table 11 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Body weight gain data of Fo females in the lactation period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
Post partum Day				
1 ~ 4	27.6 ± 11.4 (13	14.1 ± 15.8 (13	3) 16.4 ± 15.3 (10	23.6 ± 14.8 (9)

Table 12 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Food consumption of F_0 females in the pre-mating period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
Pre-mating Week				
1	142.8 ± 15.3^{a} (13)	138.2 ± 12.0 (13)	140.6 ± 15.3 (13)	128.6 ± 9.2* (13)
2	143.6 ± 15.9 (13)	139.0 ± 14.1 (13)	140.5 ± 12.5 (13)	137.4 ± 13.6 (13)

^{* :}Significant difference from control, p<0.05

a) The total consumption for a week

Table 13 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Food consumption of F. females in the pregnant period (g); Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	
Dose groups (mg/kg)	0	5 15		50	
Pregnant Day					
0~7	175.5 ± 20.7 (13)	174.0 ± 18.8 (13)	173.2 ± 14.8 (12)	168.4 ± 21.6 (13)	
7~14	193.6 ± 23.4 (13)	190.0 ± 27.2 (13)	195.6 ± 22.0 (12)	184.0 ± 26.5 (13)	
14~20	155.4 ± 15.5 (13)	156.9 ± 17.9 (13)	157.9 ± 18.3 (12)	153.2 ± 15.1 (13)	

Table 14 $Preliminary \ reproduction \ toxicity \ screening \ test \ for \ 3-Nitrobenzenamine \ in \ rats$ Food consumption of Fo females in the lactation period (g); Mean $\pm S.D.$ (N)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	. 0	5	15	50
Post partum Day				
1 ~ 4	88.2 ± 14.5 (13)	77.6 ± 20.6 (13)	72.7 ± 20.2 (10)	85.8 ± 14.1 (9)

Table 15

Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats

Summary of autopsy findings in F_0 males (macroscopic)

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Ni trobenzenami ne	3-Nitrobenzenamine	
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50	
No. of animales	13	12	13	13	
Organs and findings	·	••••••			
(Thymus) red spots/hemorrhage (Lung)		1		1	
red spots	1			2	
(Liver) enlargement accentuation of				3	
the lobular marking	1	2		2	
(Spleen) enlargement dark red/dark granular surface indistinct folliculi discolored nodules (Epididymis)			3	13 12 3 3 1	
yellow-greyish and hard nodule	1		1		

Table 16 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Summary of autopsy findings in Fe females (macroscopic)

Compounds	Vehicle control	3-Ni trobenzenamine	3-Ni trobenzenami ne	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
No. of females "	13	13	10	9
Organs and findings (Thymus)				•
red spots/hemorrhage (Lung)				. 1
red spots voluminous (Liver)		2 1	2	1
enlargement (Spleen)		1		5
enlargement dark indistinct folliculi granular surface			1	7 8 3 2
(Adrenal) enlargement yellowish nodule (Kidney)	1 1		1	1
dilated pelvis	1			
No. of females b)	0	0	3	4
(Thymus) red (Lung)				1 *
red (Stomach)				1 *
ulcer erosion poor contents full of contents				1 * 1 * 1 * 1
(Intestine) ulcer poor contents				1 2 *
(Mes.lymph n.) dark red (Spleen)				1 *
dark (Uterus)				2 *
hemorrhage				1

<sup>a): Subjected to scheduled sacrifice
b): Subjected to unscheduled sacrifice (including found dead)
*: Animal no. FB04013 died on day 23 of pregnancy</sup>

Table 17 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Summary of reproductive performance

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
No.of pairs examined	13	13 a)	13	13
No.of pairs copulated	13	13	13	13
Copulation rate (%) A)	100.0	100.0	100.0	100.0
No.of fertile copulation	13	13	12	13
Fertility (%) B)	100.0	100.0	92.3	100.0
Pairing days until copulation Mean \pm S.D.	2.2 ± 1.0	2.4 ± 1.3	2.0 ± 0.9	2.5 ± 1.1
Times of vaginal estrous Mean ± S.D.	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0

A): Copulation rate (%) = (Number of pairs copulated / Number of pairs examined) \times 100 B): Fertility (%) = (Number of fertile copulation / Number of pairs copulated) \times 100

a): The pairs consisted of 12 males and 13 females. One male (MXO2004) mated with 2 females (FBO2001 and FBO2004)

Table 18 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenanime in rats Summary of development of F1 pups up to day 4 of lactation; Mean \pm S.D.

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
No. of pregnant females	13	13	12	12
No. of pregnant females with live pups	13	13	12	12
Gestation index (%) A)	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length (days)	21.9 ± 0.3	21.6 ± 0.5	21.6 ± 0.5	21.8 ± 0.6
No. of corpora lutea	16.8 ± 1.4	17.8 ± 2.0	17.8 ± 2.7	15.9 ± 2.9
No. of implantations	16.0 ± 1.9	16.6 ± 1.6	16.5 ± 2.2	14.8 ± 2.4
Implantation index (%) B)	95.3 ± 6.1	93.4 ± 6.1	92.9 ± 7.1	93.7 ± 5.8
Day 1 No. of pups born Delivery index (%) C) No. of pups alive Birth index (%) D) Live birth index (%) E)	14.8 ± 2.4 (13 92.0 ± 6.1 (13 14.0 ± 2.4 (13 87.9 ± 12.6 (13 95.8 ± 13.1 (13) 13.7 ± 2.3 (13) 82.8 ± 13.5 (13)	$egin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	13.2 ± 2.4 (12) 88.8 ± 7.9 (12) 10.6 ± 5.6 (12) 72.0 ± 34.8 (12) 79.8 ± 37.8 (12)
Sex ratio (%) F)	44.9 ± 16.0 (13) 48.6 ± 12.0 (13)	52.3 ± 8.8 (11)	48.3 ± 13.3 (10)
Day 4 No. of pups alive Viability index (%) G)	13.6 ± 3.1 (13 96.4 ± 11.1 (13			11.5 ± 5.0 (10) 89.0 ± 31.4 (10)

A): Gestation index (χ) = (Number of pregnant females with live pups / Number of pregnant females) \times 100

B): Implantation index (χ) = (Number of implantation sites / Number of corpora lutea) \times 100

C): Delivery index (χ) = (Number of pups born / Number of implantations) \times 100

D): Birth index (%) = (Number of pups alive / Number of implantations) \times 100

E): Live birth index (%) = (Number of pups alive / Number of pups born) \times 100 F): Sex ratio (%) = (Number of male pups alive / Number of pups alive) \times 100

G): Viability index (χ) = (Number of live pups on day 4 / Number of live pups on day 1) \times 100

a): Number of litters evaluated

Table 19 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Body weights of F1 pups up to day 4 of lactation; Mean \pm S.D. (N)

Compounds	Vihicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
Day 1 (At birth) Live litter size Male Female	$14.0 \pm 2.4 (13) a)$ 6.2 ± 2.4 7.8 ± 2.9	13.7 ± 2.3 (13) 6.7 ± 2.1 7.0 ± 1.9	14.3 ± 2.9 (11) 7.4 ± 1.6 6.9 ± 2.2	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
Pup weight (g) Male Female	$\begin{array}{cccc} 6.4 & \pm & 0.7 \\ 6.6 & \pm & 0.8 \\ 6.3 & \pm & 0.8 \end{array}$	$\begin{array}{ccc} 6.4 \pm & 0.5 \\ 6.6 \pm & 0.5 \\ 6.3 \pm & 0.6 \end{array}$	6.0 ± 0.8 6.3 ± 0.8 5.8 ± 0.9	6.6 ± 0.8 6.9 ± 0.9 6.4 ± 0.8
Day 4 Live litter size Male Female	13.6 ± 3.1 (13) 5.9 ± 2.6 7.7 ± 3.0	13.7 ± 2.3 (13) 6.7 ± 2.1 7.0 ± 1.9	13.2 ± 2.9 (10) 7.2 ± 1.8 6.0 ± 1.9	12.8 ± 3.2 (9) 6.0 ± 2.2 6.8 ± 2.0
Pup weight (g) Male Female	8.7 ± 1.3 8.9 ± 1.4 8.6 ± 1.3	8.8 ± 0.9 9.0 ± 1.0 8.6 ± 0.8	$8.1 \pm 1.6 8.3 \pm 1.7 7.8 \pm 1.6$	$\begin{array}{cccc} 9.5 & \pm & 1.7 \\ 9.7 & \pm & 1.7 \\ 9.2 & \pm & 1.7 \end{array}$

a): Number of litters evaluated

Table 20
Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats
Summary of external observation of the pups

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
No. of dams having pups examined	13	13	10	9
No. of pups examined	177	178	132	115
Malformations				
No. of pups Frequencies (%)	0.5	0.0	0.0	0.0
Types and frequencies (%)				
Anal atresia Anury	0.5 a) 0.5 a)			

Vehicle control: 0.5%CMC-Na solution a): FB01005

Table 21 Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Summary of visceral observation of the pups

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50
No. of dams having pups examined	13	13	10	9
No. of pups examined	177	178	132	115
Major abnormalities No. of pups Frequencies (%)	0.0	0.7	0 0.0	0.0
Minor abnormalities No. of pups Frequencies (%)	0.6	0.0	0 0.0	0.0
Types and frequencies (%)				
Major abnormalities Diaphragmatic hernia		0.7 a)		
Minor abnormalities Dilatation of the renal pelvis	0.6			

Vehicle control: 0.5%CMC-Na solution a): FB02010

Table 22
Preliminary reproduction toxicity screening test for 3-Nitrobenzenamine in rats
Summary of skeletal observation of the pups

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine
Dose groups (mg/kg)	0	50
No. of dams having pups examined	13	. 9
No. of pups examined	177	115
Major abnormalities	3	0
No. of pups Frequencies (%)	1.6	1.5
Minor abnormalities		_
No. of pups Frequencies (%)	17 9.8	7 5.8
Types and frequencies (%)		
Major abnormalities		1.5.
Fusion of the sternebrae Absence of the ribs	0.5 b)	1.5 a)
Absence of the thoracic vertebral bodies and arches	0.5 b)	
Absence of the sacral and caudal vertebrae	0.5 c)	
Minor abnormalities		
Cervical ribs	2.1	1.6
A supernumerary sternebrae Shortening of the 13th rib	1.2	0.9
Variation in number of the lumbar vertebrae	1.8	2.6
Lumbar ribs	4.8	0.7

Vehicle control: 0.5%CMC-Na solution a):FB04005, FB04012 b):FB01011 c):FB01005

Table 23 Preliminary reproduction toxicity screeening test for 3-Nitrobenzenamine in rats Summary of morphological observations of $F_{\bf 1}$ dead pups

Compounds	Vehicle control	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	3-Nitrobenzenamine	
Dose groups (mg/kg)	0	5	15	50	
No. of dead pups examined					
External observation	9	14	35	33	
<u>Visceral observation</u>	9	13	7	13	
Skeletal observation	9	14	23	26	
No. of dead pups showing abnormalities					
External abnormalities	0	0	0	0	
<u>Visceral abnormalities</u>	0	0	0	0	
<u>Skeletal abnormalities</u>	0	2	1	2	
Minor abnormalities					
Types and frequencies (%) of skeletal abnormalities					
Minor abnormalities					
Cervical ribs	•		8.3		
Dumbbell-shaped thoracic vt. bodies		12.5			
Lumbar ribs		12.5			
Variations in the number of lumbar vertebra	e			16.7	