

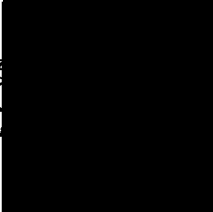


02-契-109

1,3-Dinitrobenzene の
卵巣摘出マウスを用いる
7日間反復皮下投与子宮重量試験

厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全
秦野研究





02-契-109

試験の表題： 1,3-Dinitrobenzene の卵巣摘出マウスを用いる7日間反復皮下投与子宮重量試験

試験委託者： 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室

試験計画番号： R-02-024

試験契約書番号： 02-契-109

被験物質名： 1,3-Dinitrobenzene

試験項目： 子宮重量試験

試験内容： 卵巣摘出マウスを用いる子宮重量試験

試験施設： 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
(神奈川県秦野市落合729-5)

運営管理者： 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
所長



試験の表題： 1,3-Dinitrobenzene の卵巣摘出マウスを用いる7日間反復皮下投与子宮重量試験

試験責任者： [redacted] (安全性試験室)

試験担当者 (○主担当者)：

投与・観察： ○ [redacted]

動物飼育管理： ○ [redacted]

病理学検査： ○ [redacted]

検体調製： ○ [redacted]

被験物質管理： ○ [redacted]

この報告書には、表題の試験について、試験計画書に従って確実に遂行された結果が正しく記載されております。

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

安全性試験室

[redacted]

[redacted]

【目 次】

	頁
要約	1
試験目的	2
方法	3
1. 被験物質	3
2. 陽性対照物質	3
3. 使用動物および飼育方法	3
4. 投与検体の調製	3
5. 投与量の設定および投与方法	4
6. 観察および検査	4
7. データ解析法	5
結果	6
1. 一般状態	6
2. 体重	6
3. 剖検所見	6
4. 子宮重量	6
考察	7
文献	8
Figs. 1~2	
Tables 1~2	
Appendices 1~2	

【要 約】

卵巣摘出した C57BL/6J 系マウスに 1,3-dinitrobenzene を投与して、被験物質が生体内においてエストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用を示すか否かを検査した。エストロゲン作用を調べる目的で 0 (溶媒対照群)、0.3、1、3 および 10 mg/kg/day の 1,3-dinitrobenzene を単独皮下投与した群、陽性対照として 0.2 µg/kg/day のエチニルエストラジオール (以下 EE と略記) を皮下投与した群、さらには抗エストロゲン作用を調べる目的で 0.6 µg/kg/day の EE を皮下投与し、同時に 0 (溶媒対照群)、0.3、1、3 および 10 mg/kg/day の 1,3-dinitrobenzene を皮下投与した群を設けた。1,3-dinitrobenzene および EE の投与は、1 日 1 回、7 日間にわたり反復して行い、最終投与の約 24 時間後に屠殺して、子宮の重量を測定した。

死亡例および一般状態の異常は、いずれの投与群においても観察されなかった。体重についても、被験物質各投与群と溶媒対照群との間に有意差は認められなかった。剖検時に脾臓の腫大が 10 mg/kg 投与群で観察された。

1,3-Dinitrobenzene を単独投与した群の子宮重量、および被験物質と EE を併用投与した群の子宮重量に、投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、1,3-dinitrobenzene は、生体内においてエストロゲン作用または抗エストロゲン作用を示さないものと判断された。

【試 験 目 的】

子宮重量試験法は、化学物質のエストロゲン作用および抗エストロゲン作用をインビボで短期に検出する方法として、内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験への応用が期待されている¹⁾。これまでに、合成エストロゲン剤のエチニルエストラジオールを用いて、子宮重量試験法のエストロゲン作用評価における有効性について確認し²⁾、さらに、エストロゲン受容体のアンタゴニストである ZM189,154 をエチニルエストラジオールと併用投与して子宮重量試験法の抗エストロゲン作用評価における有効性についても検討してきた²⁾。今回、卵巣摘出マウスに 1,3-dinitrobenzene を単独投与あるいはエチニルエストラジオールとの併用投与を実施して、被験物質の生体内におけるエストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用の有無を検討した。なお、本試験は、子宮重量試験に関する OECD バリデーションワークのプロトコール C (2000 年 4 月 21 日草案) に準拠して行った。

【方 法】

1. 被験物質

試験には、1,3-dinitrobenzene (CAS No.: 99-65-0、略称: DNB、純度: 99.0%、ロット番号: ████████ 入手先: ████████) を使用した。被験物質は、使用時まで被験物質受領保管室において室温で保管した。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質として、合成エストロゲンのエチニルエストラジオール (CAS No. 57-63-6、略称: EE、純度: 99.0%、ロット番号: ELJ6671、入手先: 和光純薬工業(株)) を使用した。陽性対照物質は、使用時まで被験物質保管室において冷蔵、遮光条件下で保管した。

3. 使用動物および飼育方法

試験には、6週齢時に卵巣を摘出した C57BL/6J 系雌マウス (日本エスエルシー生産) を財団法人動物繁殖研究所より 6.5 週齢 (卵巣摘出後 3 日) で入手して、使用した。動物は、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて入荷後 7 日間、予備飼育したのち、一般状態に異常が認められなかった動物を試験に供した。なお、検疫終了翌日から 4 日間は毎日膈スミアを採取し、性周期が回帰していないことを確認した。卵巣摘出動物は、8 週齢時の投与開始前日に測定した体重を基に、体重別層化無作為抽出法により、群分けした。なお、性周期観察で発情が認められた動物は群分けの対象から除外した。群分けした動物には、油性フェルトペンにより尾に個体識別した。また、各飼育ケージには、投与群ごとに色彩の異なる動物カードに試験計画番号および個体識別番号を記入して掛けた。

動物は、許容温度 21.0~25.0°C、許容湿度 40.0~75.0%、換気回数約 15 回/時、照明 12 時間 (7 時~19 時点灯) に制御された飼育室で、床敷としてペパークリーン (日本エスエルシー(株)) を入れた TPX 樹脂製ケージ (235w×325d×170h mm) に 6 匹ずつ収容し、固型飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) および水道水 (秦野市水道局給水) を自由に摂取させて飼育した。

4. 投与検体の調製

投与検体のうち被験物質の作製に際しては、正確に秤量した被験物質をメノウ乳鉢で摩砕後、コーン油 (ナカライテスク(株)、製造番号: V2P1825) を加えて最高濃度の投与検体を作製し、ついで、これをコーン油で希釈して所定の濃度に調製した。EE 溶液は、秤量した EE を少量のエタノール (和光純薬工業(株)) に溶解後、コーン油 (ナカライテスク(株)、製造番号: V2P1825) に溶解して調製した。調製した投与検体は、いずれも気密、冷蔵、遮光の条件下で保管し、調製後 8 日以内に使用した。

5. 投与量の設定および投与方法

被験物質の投与量は毒性予備試験の結果および 1,3-dinitrobenzene の経口投与子宮重量試験の結果³⁾から設定した。毒性予備試験では、C57BL/6J 系雌マウスを用いて 3、10、30、100、300 および 1000 mg/kg/day の被験物質投与群を設け、各群 3 匹に 3 日間反復皮下投与した結果、100 mg/kg 以上の投与群で死亡が認められたが、7 日間反復経口投与子宮重量試験においては 30 mg/kg 投与群の全例が死亡したことから、本試験の投与量は 0.3、1、3 および 10 mg/kg/day とした。陽性対照群には 0.2 µg/kg/day の EE を皮下投与し、併用投与群には 0.6 µg/kg/day の EE を皮下投与した。投与は、マイクロシリンジおよび注射針を用いて、毎日、13 時から 15 時の間に、1 日 1 回ずつ 7 日間にわたり行った。溶媒対照群の動物には被験物質の溶媒であるコーン油を投与し、併用投与を実施した群は、被験物質を先に皮下投与し、15 分以内に EE を皮下投与した。投与液量の算出は毎日測定された体重を基に行った。

各群の投与量、投与容量および動物番号は次の通りである。

群	投与量		投与容量		動物番号	
	DNB (mg/kg)	EE (µg/kg)	DNB (mL/kg)	EE (mL/kg)		
エストロゲン作用	1 溶媒対照群	0	—	4*	—	FX01001~FX01006
	2 低用量群	0.3	—	4	—	FX02001~FX02006
	3 中低用量群	1	—	4	—	FX03001~FX03006
	4 中高用量群	3	—	4	—	FX04001~FX04006
	5 高用量群	10	—	4	—	FX05001~FX05006
	6 陽性対照群	—	0.2	—	2	FX06001~FX06006
抗エストロゲン作用	7 溶媒対照群	0	0.6	4*	2	FX07001~FX07006
	8 低用量群	0.3	0.6	4	2	FX08001~FX08006
	9 中低用量群	1	0.6	4	2	FX09001~FX09006
	10 中高用量群	3	0.6	4	2	FX10001~FX10006
	11 高用量群	10	0.6	4	2	FX11001~FX11006

*: コーン油

6. 観察および検査

1) 一般状態

全例について、飼育期間中、毎日 1 回以上（投与期間中は投与前および投与後）観察した。

2) 体重測定

全例について投与開始日、投与期間中毎日および解剖日に測定した。

3) 子宮重量測定

全例について、最終投与の約 24 時間後に、頸椎脱臼法により放血、致死させ、卵巣が残存していないか確認しながら、子宮および腔を一括して摘出した。摘出後は、すみやかに氷冷し、実体顕微鏡下で、脂肪を除去した後、腔を子宮頸の外子宮口側で子宮から切り離した。子宮重量は、子宮内液を含んだ状態でまず測定し (wet weight)、次に子宮壁の一部を切開し、子宮内液をガーゼで吸い取った後、再度、重量を測定した (blotted weight)。

7. データ解析法

体重および子宮重量は、群ごとの平均値±標準偏差で表した。得られたデータは一元配置型の分散分析法を用いて解析し、有意性が認められた場合には、溶媒対照群を基準群として、Dunnett の多重比較検定を行った。ただし、陽性対照群と溶媒対照群の比較については、Student の t 検定を用いた。有意水準は 5 および 1 % とした。

【結 果】

1. 一般状態

いずれの投与群においても、死亡動物は認められず、一般状態にも異常は観察されなかった。

2. 体重 (Table 1、Appendix 1)

体重については、被験物質各投与群あるいは陽性対照群と溶媒対照群との間に有意差は認められなかった。

3. 剖検所見

剖検時に、10 mg/kg 投与群の全例に脾臓の腫大が確認された。

4. 子宮重量 (Table 2、Appendix 2)

エストロゲン作用を調べる目的の被験物質単独投与群 (Fig. 1) において、被験物質各投与群と溶媒対照群の子宮重量に有意差は認められなかった。なお、陽性対照群においては、子宮の重量および相対重量が溶媒対照群より有意に増加した。

抗エストロゲン作用を調べる目的の EE 併用投与群 (Fig. 2) においても、被験物質各投与群と溶媒対照群の子宮重量に有意差は認められなかった。

【考 察】

卵巣摘出した C57BL/6J 系マウスに 1,3-dinitrobenzene を皮下投与して、生体内におけるエストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用の有無を検討した。

死亡例および一般状態の異常は観察されず、体重推移にも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。剖検時に脾臓の腫大が 10 mg/kg 投与群で観察されたことから、1,3-dinitrobenzene の皮下投与における毒性学的無影響量は 3 mg/kg/day と考えられる。

子宮重量については、被験物質単独および EE 併用投与のいずれにおいても、被験物質投与群と溶媒対照群との間に有意差はみられなかった。1,3-Dinitrobenzene を経口投与した子宮重量試験³⁾においても子宮重量の変化は認められていないことから、1,3-dinitrobenzene は生体内におけるエストロゲン作用および抗エストロゲン作用はないものと考えられる。

以上の結果から、1,3-dinitrobenzene は皮下投与により、生体内でエストロゲン作用または抗エストロゲン作用を示さないものと判断された。

【文 献】

- 1) 菅野純, 松島裕子, 永井賢司, 金子豊蔵: 子宮肥大試験およびハーシューバーガー試験, 井上達監修「内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法」, シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京 (2000) pp. 49-75
- 2) Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J, Owens, W. : The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ. Health Perspect. 109 : 785-794 (2001)
- 3) 太田亮: 1,3-Dinitrobenzeneの卵巣摘出マウスを用いる7日間反復経口投与子宮重量試験 (試験計画番号: R-02-023), 秦野研究所報告書

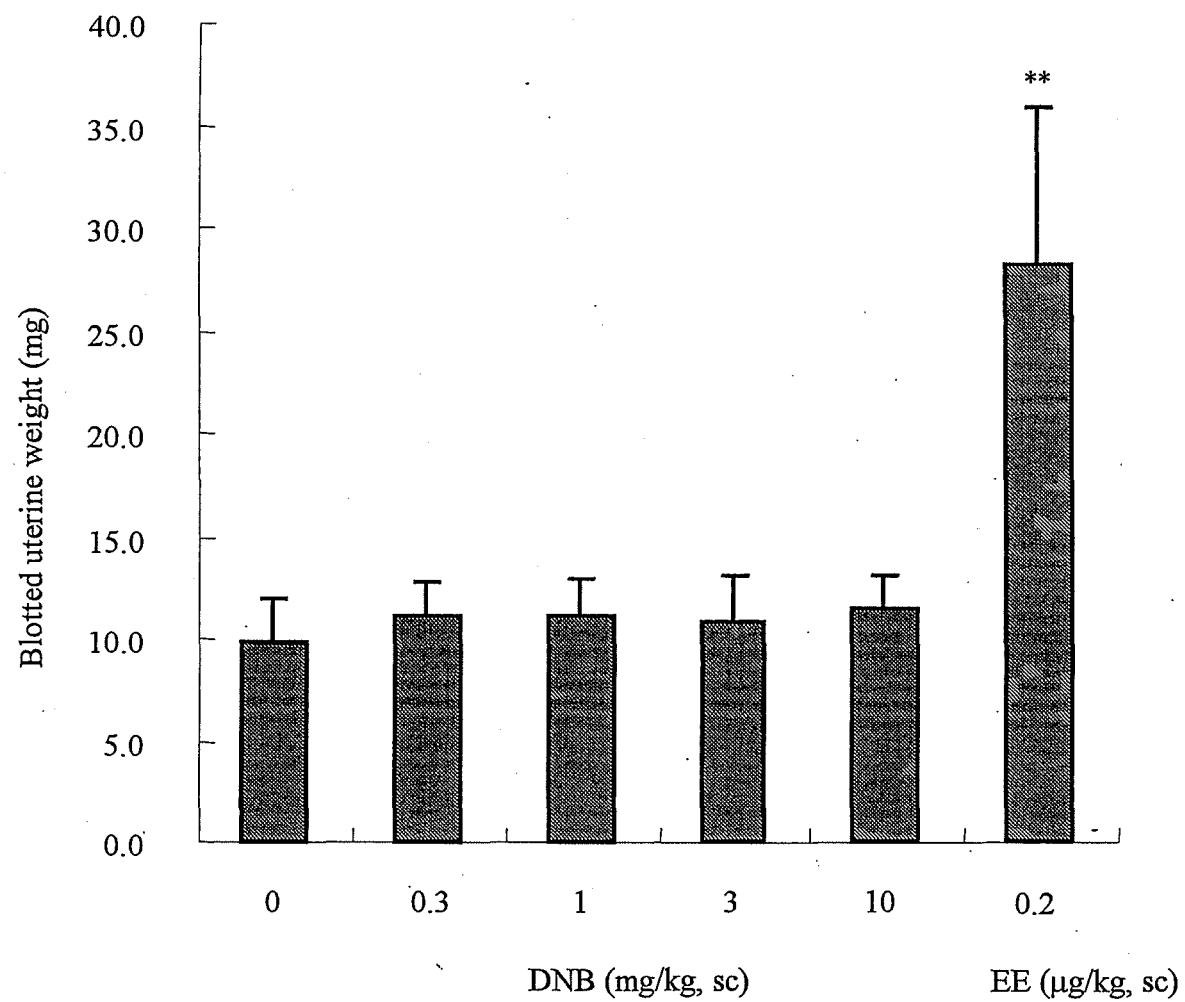


Fig. 1 Uterotrophic assay of DNB for estrogenic activity detection in ovariectomized C57BL/6J mice

DNB, 1,3-dinitrobenzene

EE, ethinylestradiol

** , Significant difference from 0 mg/kg group ($p < 0.01$)

Bar, S.D.

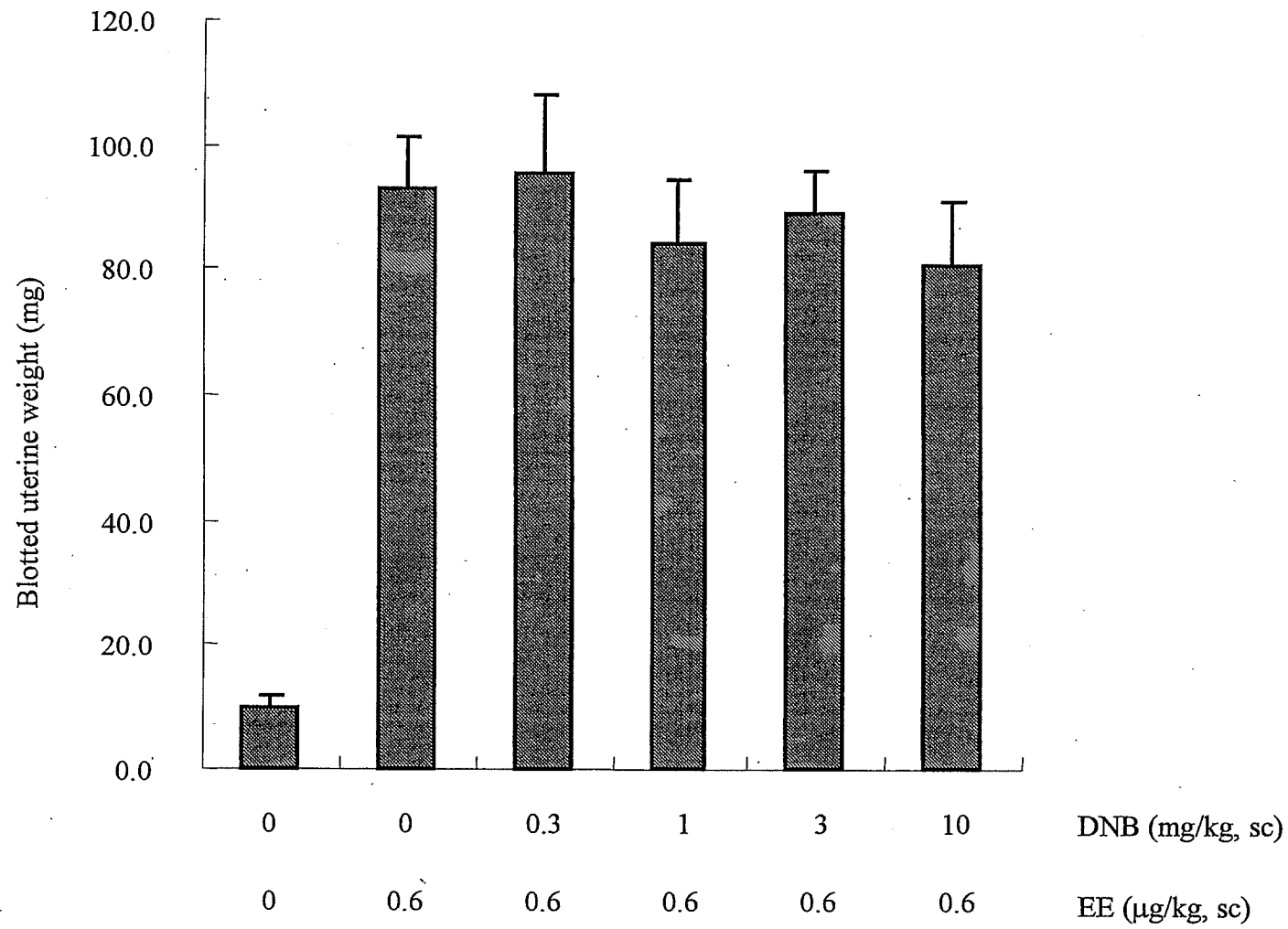


Fig. 2 Uterotrophic assay of DNB for antiestrogenic activity detection in ovariectomized C57BL/6J mice

DNB, 1,3-dinitrobenzene

EE, ethinylestradiol

Bar, S.D.

Table 1

R-02-024

Uterotrophic assay of 1,3-dinitrobenzene in ovariectomized C57BL/6J mice

Administration route: subcutaneous

Body weight (g); mean \pm S.D. (N)

Treatment group	Days of treatment			
	1	2	3	4
DNB 0 (corn oil)	20.0 \pm 0.7 (6)	20.3 \pm 0.9 (6)	20.7 \pm 0.8 (6)	20.6 \pm 0.8 (6)
DNB 0.3	20.2 \pm 0.6 (6)	20.7 \pm 0.5 (6)	20.9 \pm 0.5 (6)	20.9 \pm 0.5 (6)
DNB 1	19.9 \pm 0.6 (6)	20.5 \pm 0.6 (6)	20.6 \pm 0.6 (6)	20.7 \pm 0.7 (6)
DNB 3	20.0 \pm 0.6 (6)	20.6 \pm 0.7 (6)	20.8 \pm 0.7 (6)	20.7 \pm 0.8 (6)
DNB 10	20.0 \pm 0.8 (6)	20.5 \pm 1.0 (6)	20.7 \pm 0.7 (6)	21.0 \pm 1.0 (6)
EE 0.2	20.0 \pm 0.5 (6)	20.4 \pm 0.6 (6)	20.7 \pm 0.8 (6)	20.8 \pm 0.6 (6)
.....				
DNB 0 & EE 0.6	19.9 \pm 0.6 (6)	20.8 \pm 0.4 (6)	21.1 \pm 0.7 (6)	21.2 \pm 0.8 (6)
DNB 0.3 & EE 0.6	19.9 \pm 0.8 (6)	20.6 \pm 0.8 (6)	20.7 \pm 0.8 (6)	21.1 \pm 0.7 (6)
DNB 1 & EE 0.6	20.1 \pm 0.5 (6)	20.9 \pm 0.6 (6)	21.0 \pm 0.7 (6)	21.2 \pm 0.9 (6)
DNB 3 & EE 0.6	20.2 \pm 0.4 (6)	21.0 \pm 0.5 (6)	21.2 \pm 0.8 (6)	21.5 \pm 0.7 (6)
DNB 10 & EE 0.6	20.1 \pm 0.7 (6)	20.8 \pm 0.7 (6)	20.9 \pm 0.6 (6)	21.3 \pm 0.7 (6)
.....				
Treatment group	Days of treatment			
	5	6	7	8
DNB 0 (corn oil)	21.1 \pm 0.9 (6)	20.6 \pm 0.8 (6)	20.9 \pm 0.8 (6)	20.8 \pm 0.8 (6)
DNB 0.3	21.1 \pm 0.7 (6)	21.0 \pm 0.6 (6)	21.3 \pm 0.7 (6)	20.9 \pm 0.6 (6)
DNB 1	20.8 \pm 0.7 (6)	20.8 \pm 0.8 (6)	21.1 \pm 1.0 (6)	21.1 \pm 0.9 (6)
DNB 3	21.1 \pm 0.8 (6)	20.7 \pm 0.8 (6)	20.9 \pm 0.9 (6)	20.9 \pm 0.9 (6)
DNB 10	21.2 \pm 1.0 (6)	20.9 \pm 1.1 (6)	21.3 \pm 1.2 (6)	21.3 \pm 1.0 (6)
EE 0.2	21.0 \pm 0.5 (6)	20.7 \pm 0.8 (6)	20.6 \pm 0.8 (6)	20.6 \pm 0.8 (6)
.....				
DNB 0 & EE 0.6	21.4 \pm 0.7 (6)	20.9 \pm 1.6 (6)	20.9 \pm 1.6 (6)	20.9 \pm 1.4 (6)
DNB 0.3 & EE 0.6	21.5 \pm 1.0 (6)	21.1 \pm 0.9 (6)	21.5 \pm 0.9 (6)	21.2 \pm 1.1 (6)
DNB 1 & EE 0.6	21.7 \pm 0.9 (6)	21.5 \pm 1.0 (6)	21.9 \pm 0.9 (6)	21.7 \pm 1.0 (6)
DNB 3 & EE 0.6	21.8 \pm 0.7 (6)	21.7 \pm 0.7 (6)	21.9 \pm 0.8 (6)	22.0 \pm 0.8 (6)
DNB 10 & EE 0.6	21.8 \pm 0.8 (6)	21.5 \pm 0.7 (6)	21.7 \pm 0.7 (6)	21.8 \pm 0.8 (6)

DNB, 1,3-dinitrobenzene (mg/kg)

EE, ethinylestradiol (μ g/kg)

Table 2

R-02-024

Uterotrophic assay of 1,3-dinitrobenzene in ovariectomized C57BL/6J mice

Administration route: subcutaneous

Uterine weight; mean \pm S.D. (N)

Treatment group	Final body weight (g)			Wet uterine weight						Blotted uterine weight					
	Absolute (mg)	Relative (a)	(N)	Absolute (mg)	Relative (a)	(N)	Absolute (mg)	Relative (a)	(N)	Absolute (mg)	Relative (a)	(N)			
DNB 0 (corn oil)	20.8 \pm 0.8	(6)	10.5 \pm 2.3	(6)	50.1 \pm 10.1	(6)	9.9 \pm 2.1	(6)	47.4 \pm 8.9	(6)					
DNB 0.3	20.9 \pm 0.6	(6)	11.6 \pm 1.7	(6)	55.5 \pm 8.6	(6)	11.1 \pm 1.7	(6)	53.0 \pm 8.6	(6)					
DNB 1	21.1 \pm 0.9	(6)	11.6 \pm 1.9	(5)	54.0 \pm 7.9	(5)	11.1 \pm 1.9	(5)	52.0 \pm 7.9	(5)					
DNB 3	20.9 \pm 0.9	(6)	11.3 \pm 2.4	(6)	53.9 \pm 9.7	(6)	10.8 \pm 2.4	(6)	51.5 \pm 9.6	(6)					
DNB 10	21.3 \pm 1.0	(6)	12.0 \pm 1.6	(6)	56.2 \pm 5.4	(6)	11.5 \pm 1.7	(6)	53.9 \pm 5.8	(6)					
EE 0.2	20.6 \pm 0.8	(6)	29.1 \pm 7.9 **	(5)	142.9 \pm 39.4 **	(5)	28.3 \pm 7.6 **	(5)	138.8 \pm 37.6 **	(5)					

DNB 0 & EE 0.6	20.9 \pm 1.4	(6)	108.8 \pm 16.2	(6)	519.7 \pm 55.8	(6)	93.0 \pm 8.4	(6)	445.5 \pm 30.5	(6)					
DNB 0.3 & EE 0.6	21.2 \pm 1.1	(6)	114.6 \pm 27.0	(6)	543.4 \pm 130.3	(6)	95.2 \pm 13.0	(6)	452.0 \pm 74.0	(6)					
DNB 1 & EE 0.6	21.7 \pm 1.0	(6)	98.0 \pm 21.0	(6)	453.6 \pm 108.1	(6)	84.2 \pm 10.3	(6)	389.1 \pm 55.5	(6)					
DNB 3 & EE 0.6	22.0 \pm 0.8	(6)	98.6 \pm 11.8	(6)	449.5 \pm 58.5	(6)	88.9 \pm 7.2	(6)	404.7 \pm 34.2	(6)					
DNB 10 & EE 0.6	21.8 \pm 0.8	(6)	88.5 \pm 13.7	(6)	406.2 \pm 55.0	(6)	80.8 \pm 10.3	(6)	371.1 \pm 42.5	(6)					

DNB, 1,3-dinitrobenzene (mg/kg)

EE, ethinylestradiol (μ g/kg)

a, relative weight (mg per 100 g final body weight)

**, Significant difference from 0mg/kg group (p<0.01)

Uterotrophic assay of 1,3-dinitrobenzene in ovariectomized C57BL/6J mice

Administration route: subcutaneous

Uterine weight

2-1 Vehicle control; DNB 0 mg/kg (corn oil 4 mL/kg)

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX01001	21.7	14.4	66.4	13.3	61.3
FX01002	21.2	10.5	49.5	9.9	46.7
FX01003	19.4	8.0	41.2	7.6	39.2
FX01004	20.7	11.4	55.1	10.8	52.2
FX01005	21.4	8.2	38.3	7.9	36.9
FX01006	20.5	10.3	50.2	9.9	48.3
Mean	20.8	10.5	50.1	9.9	47.4
S.D.	0.8	2.3	10.1	2.1	8.9
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)

2-2 DNB 0.3 mg/kg

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX02001	21.1	8.6	40.8	8.1	38.4
FX02002	20.0	12.4	62.0	11.8	59.0
FX02003	21.1	13.6	64.5	13.1	62.1
FX02004	21.0	10.8	51.4	10.4	49.5
FX02005	21.8	12.0	55.0	11.2	51.4
FX02006	20.5	12.2	59.5	11.8	57.6
Mean	20.9	11.6	55.5	11.1	53.0
S.D.	0.6	1.7	8.6	1.7	8.6
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)

2-3 DNB 1 mg/kg

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX03001	19.8	Rudimentary uterus			
FX03002	21.6	13.8	63.9	13.4	62.0
FX03003	21.4	12.4	57.9	11.9	55.6
FX03004	20.4	10.0	49.0	9.9	48.5
FX03005	22.5	12.5	55.6	11.9	52.9
FX03006	21.1	9.2	43.6	8.6	40.8
Mean	21.1	11.6	54.0	11.1	52.0
S.D.	0.9	1.9	7.9	1.9	7.9
(N)	(6)	(5)	(5)	(5)	(5)

2-4 DNB 3 mg/kg

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX04001	19.8	9.9	50.0	9.3	47.0
FX04002	22.2	13.6	61.3	12.9	58.1
FX04003	21.7	14.1	65.0	13.7	63.1
FX04004	20.7	9.2	44.4	8.8	42.5
FX04005	20.3	8.5	41.9	8.1	39.9
FX04006	20.6	12.5	60.7	12.0	58.3
Mean	20.9	11.3	53.9	10.8	51.5
S.D.	0.9	2.4	9.7	2.4	9.6
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)

a, relative weight (mg per 100 g final body weight)

Uterotrophic assay of 1,3-dinitrobenzene in ovariectomized C57BL/6J mice

Administration route: subcutaneous

Uterine weight

2-5 DNB 10 mg/kg

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX05001	20.9	11.6	55.5	11.1	53.1
FX05002	19.8	9.7	49.0	9.0	45.5
FX05003	21.5	13.8	64.2	13.3	61.9
FX05004	21.8	11.6	53.2	11.1	50.9
FX05005	22.9	13.8	60.3	13.5	59.0
FX05006	20.9	11.5	55.0	11.1	53.1
Mean	21.3	12.0	56.2	11.5	53.9
S.D.	1.0	1.6	5.4	1.7	5.8
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)

2-6 Positive control; EE 0.2 µg/kg

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX06001	21.0	33.0	157.1	32.2	153.3
FX06002	20.9	32.4	155.0	31.4	150.2
FX06003	19.6	20.8	106.1	20.3	103.6
FX06004	19.7	38.5	195.4	37.1	188.3
FX06005	20.6	20.8	101.0	20.3	98.5
FX06006	21.5	Pyometra			
Mean	20.6	29.1	142.9	28.3	138.8
S.D.	0.8	7.9	39.4	7.6	37.6
(N)	(6)	(5)	(5)	(5)	(5)

2-7 DNB 0 mg/kg (corn oil 4 mL/kg) & EE 0.6 µg/kg

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX07001	21.5	116.3	540.9	101.4	471.6
FX07002	21.7	133.7	616.1	99.8	459.9
FX07003	21.3	110.9	520.7	99.3	466.2
FX07004	21.6	99.1	458.8	91.0	421.3
FX07005	21.2	107.2	505.7	83.7	394.8
FX07006	18.0	85.7	476.1	82.7	459.4
Mean	20.9	108.8	519.7	93.0	445.5
S.D.	1.4	16.2	55.8	8.4	30.5
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)

2-8 DNB 0.3 mg/kg & EE 0.6 µg/kg

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX08001	20.4	109.6	537.3	97.5	477.9
FX08002	22.5	77.6	344.9	74.8	332.4
FX08003	22.1	157.3	711.8	108.9	492.8
FX08004	21.7	97.7	450.2	84.5	389.4
FX08005	20.0	120.9	604.5	100.1	500.5
FX08006	20.3	124.2	611.8	105.3	518.7
Mean	21.2	114.6	543.4	95.2	452.0
S.D.	1.1	27.0	130.3	13.0	74.0
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)

a, relative weight (mg per 100 g final body weight)

Uterotrophic assay of 1,3-dinitrobenzene in ovariectomized C57BL/6J mice

Administration route: subcutaneous

Uterine weight

2-9 DNB 1 mg/kg & EE 0.6 μ g/kg

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX09001	23.0	103.1	448.3	92.2	400.9
FX09002	22.8	71.3	312.7	69.2	303.5
FX09003	20.3	103.1	507.9	87.9	433.0
FX09004	21.6	78.9	365.3	73.2	338.9
FX09005	21.1	130.8	619.9	93.2	441.7
FX09006	21.5	100.5	467.4	89.5	416.3
Mean	21.7	98.0	453.6	84.2	389.1
S.D.	1.0	21.0	108.1	10.3	55.5
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)

2-10 DNB 3 mg/kg & EE 0.6 μ g/kg

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX10001	22.9	97.6	426.2	90.1	393.4
FX10002	22.2	98.7	444.6	92.6	417.1
FX10003	22.1	118.9	538.0	100.4	454.3
FX10004	22.7	84.3	371.4	80.2	353.3
FX10005	20.7	102.1	493.2	87.0	420.3
FX10006	21.3	90.2	423.5	83.0	389.7
Mean	22.0	98.6	449.5	88.9	404.7
S.D.	0.8	11.8	58.5	7.2	34.2
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)

2-11 DNB 10 mg/kg & EE 0.6 μ g/kg

Animal no.	Final body weight (g)	Wet uterine weight		Blotted uterine weight	
		Absolute (mg)	Relative (a)	Absolute (mg)	Relative (a)
FX11001	22.9	109.5	478.2	95.9	418.8
FX11002	21.9	92.8	423.7	84.1	384.0
FX11003	21.8	92.7	425.2	79.1	362.8
FX11004	22.2	72.3	325.7	70.5	317.6
FX11005	20.9	89.2	426.8	86.6	414.4
FX11006	20.8	74.4	357.7	68.4	328.8
Mean	21.8	88.5	406.2	80.8	371.1
S.D.	0.8	13.7	55.0	10.3	42.5
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)

a, relative weight (mg per 100 g final body weight)