

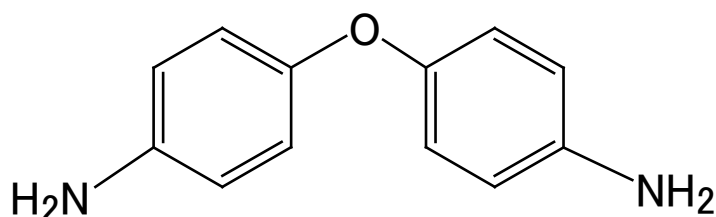
4, 4'-Diaminodiphenyl ether (4, 4'-Oxybisbenzenamine)

4, 4'-ジアミノジフェニルエーテル

[CAS No. 101-80-4]

Molecular formula: C₁₂H₁₂N₂O

Molecular weight: 200.24



ABSTRACT

1. Material and method

Purity	: 99.4%
Test species/strain	: Rat/Crl:CD(SD)
Test method	: OECD Test Guideline 422
Route	: Oral (gavage)
Dosages	: 0, 3, 10, 30 mg/kg
Dosages for recovery	: 0, 30 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 12 (5 for recovery) ; Females, 12; Satellite females, 5
Vehicle	: Olive oil
Administration period	: Males, 42 days Females, from 14 days before mating to day 4 of lactation Females (satellite), 42 days
Recovery period	: Males, 14 days Females (satellite), 14 days
Terminal killing	: Males, day 43 of treatment and 15 of recovery Females, day 5 of lactation Females (satellite), day 15 of recovery Offspring, day 4 after birth
GLP	: Yes

2. Results

Repeated dose toxicity

Four females in the 30 mg/kg-dosed group died at the end of pregnancy. Locomotor activity was increased in the females given 30 mg/kg. Food consumption was temporarily increased in the both sexes given 30 mg/kg. No compound-related effects were observed on clinical sign of male and body weight of both sexes.

No compound-related effect on urinary parameters was observed in any dosed group of either sex. As principal changes in hematological examination, decreases in RBC and increases in reticulocytes were observed in 10 and 30 mg/kg-dosed groups of male and 30 mg/kg-dosed group of female. Blood biochemical examination revealed increased total bilirubin in the males given 10 mg/kg and above, and AST, ALT and ALP in the males given 30 mg/kg.

Thyroid and spleen weights were increased in the both sexes given 30 mg/kg. Thymus weight was decreased in the females given 30 mg/kg. In histopathological examination, follicular hyperplasia of thyroid was observed in the males given 30 mg/kg, and centrilobular hypertrophy of hepatocytes and granulation in the liver were observed in both sexes given 30 mg/kg. Hemosiderin deposition in the spleen was increased in the males given 10 mg/kg and above and in the females given 30 mg/kg. Additionally, extramedullary hematopoiesis in the spleen was increased in the males given 30 mg/kg,

Reproductive and developmental toxicity

No compound-related effect on estrous cycle, copulation, fertility was observed at any dose level. However, the four pregnant females in the 30 mg/kg-dosed group died at the end of pregnancy. No abnormality of delivery was observed in survivors. The numbers of pups born and live pups were slightly decreased in the delivered females given 30 mg/kg. In this group, birth index and body weight of pups were decreased, and the numbers of pups with jaundice and dead pups were increased. But neglect of nursing of dams was not observed.

3. Evaluation

No observed effect level (NOEL)

For the repeated dose toxicity, the endpoint for a NOEL was the evidence of anemia in the males given 10 mg/kg and above, and mortality in the females given 30 mg/kg. For the reproductive/developmental toxicity, mortality of females at the end of pregnancy and increased the number of dead pups in the 30 mg/kg-dosed group.

It was concluded that a NOEL for the repeated dose toxicity of 4,4'-Diaminodiphenyl ether was 3 mg/kg/day for males and 10 mg/kg/day for females, and that a NOEL for the reproductive/developmental toxicity was 10 mg/kg/day.

No observed adverse effect level (NOAEL)

For the repeated dose toxicity, the endpoint for a NOAEL was the evidence of anemia in the males given 10 mg/kg and above, and mortality in the females given 30 mg/kg. For the reproductive/developmental toxicity, mortality of females at the end of pregnancy and increased the number of dead pups in the 30 mg/kg-dosed group.

It was concluded that a NOAEL for the repeated dose toxicity of 4,4'-Diaminodiphenyl ether was 3 mg/kg/day for males and 10 mg/kg/day for females, and that a NOAEL for the reproductive/developmental toxicity was 10 mg/kg/day.

4,4'-ジアミノジフェニルエーテルの ラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 4,4'-Diaminodiphenyl ether by Oral Administration in Rats

要約

4,4'-ジアミノジフェニルエーテルの反復投与毒性および生殖発生毒性を検討するために、OECD テストガイドライン 422 に基づき、試験を実施した。

本試験では、4,4'-ジアミノジフェニルエーテルを、0（媒体対照、オリブ油）、3、10 および 30 mg/kg の用量で、CrI:CD(SD)ラットの雌雄（12 匹/群、10 週齢）に、雄では 42 日間、雌では哺育 4 日までの 42～55 日間、毎日、強制経口投与し、雌雄動物に対する反復投与の影響、ならびに親動物の生殖および哺育 4 日までの児動物の発生・発育に及ぼす影響を検討した。対照群と 30 mg/kg 投与群については、雄では交配に供した 12 匹のうち 5 匹を、雌では交配に供した動物とは別にサテライト雌 5 匹を用意し、42 日間の反復投与終了後、2 週間の回復期間を設けた。結果は以下のように要約される。

1. 反復投与毒性

30 mg/kg 群の雌 4 例が妊娠末期に死亡した。また、30 mg/kg 群では雌に自発運動量の増加、雌雄に摂餌量の一時的な減少が認められた。雄の一般状態や雌雄の体重に投与の影響は認められなかった。

尿検査の結果に投与の影響は認められなかった。血液学検査の結果、赤血球数の減少と網赤血球比の増加が主な所見としてみられ、雄では 10 mg/kg 群と 30 mg/kg 群に、雌では 30 mg/kg 群に認められた。血液生化学検査結果の主な所見としては、総ビリルビンの増加が 10 mg/kg 群と 30 mg/kg 群の雄に、AST、ALT および ALP の増加が 30 mg/kg 群の雄に認められた。

器官重量測定の結果、30 mg/kg 群の雌雄に甲状腺と脾臓の重量増加がみられ、雌の 30 mg/kg 群では胸腺重量の減少も認められた。病理組織学検査の結果、雄の 30 mg/kg 群の甲状腺に濾胞の過形成が認められ、雌雄の 30 mg/kg 群の肝臓には小葉中心性の肝細胞肥大と肉芽形成が観察された。また、脾臓にはヘモジデリン沈着の増加が雄は 10 mg/kg 群から、雌は 30 mg/kg 群にみられ、雄の 30 mg/kg 群では随外造血巣の増加も観察された。

2. 生殖発生毒性

性周期や交配能力に投与の影響は認められなかった。30 mg/kg 群では雌 4 例が分娩できずに死亡したが、生存雌の分娩に関して異常は認められなかった。30 mg/kg 群の出産雌には産児数や出生児数の減少傾向がみられ、児の生存率や体重には減少がみられ、黄疸を呈して死亡

する例が増加した。母動物による哺育不全は認められなかった。

3. 無作用量 (NOEL: No Observed Effect Level)

反復投与毒性に関して、NOEL 決定のエンドポイントを、雄では 10 mg/kg の用量からみられた貧血所見とし、雌では 30 mg/kg の用量でみられた死亡とした。また、生殖発生毒性に関しては、30 mg/kg の用量でみられた妊娠末期の死亡および児動物の死亡増加とした。

したがって、本試験における 4,4'-ジアミノジフェニルエーテルの NOEL は、反復投与毒性に関しては雄では 3 mg/kg/day、雌では 10 mg/kg/day と結論される。また、生殖発生毒性に関しては 10 mg/kg/day であると結論される。

4. 無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

反復投与毒性に関して、NOAEL 決定のエンドポイントを、雄では 10 mg/kg の用量からみられた貧血所見とし、雌では 30 mg/kg の用量でみられた死亡とした。また、生殖発生毒性に関しては、30 mg/kg の用量でみられた妊娠末期の死亡および児動物の死亡増加とした。

したがって、本試験における 4,4'-ジアミノジフェニルエーテルの NOAEL は、反復投与毒性に関しては雄では 3 mg/kg/day、雌では 10 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しては 10 mg/kg/day であると結論される。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製法

被験物質の 4,4'-ジアミノジフェニルエーテルは、XXXXXXXXXX 購入（ロット番号: SDF1107）したもので、純度 99.4% のうすい褐色微細結晶である。被験物質は入手後、使用時まで室温で暗所に保管した。被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（Shimadzu FTIR-8200PC）を用いて測定し、文献値と比較することにより確認した。また、被験物質の安定性は、使用開始前および使用終了後にクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ（Hewlett Packard 1090）を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

媒体として選択したオリブ油（日本薬局方）は丸石製薬から購入（ロット番号: 6309）し、使用時まで室温で

暗所に保管した。投与検体（懸濁液）は、被験物質をオリブ油と混和して、各用量の1回の投与液量が5 mL/kg 体重になるように調製した。投与検体は8日間の安定性試験の結果に基づき、1週に1回の頻度で調製し、室温で暗所に保管して調製7日以内に使用した。投与検体中の被験物質の濃度および均一性は、初回調製時に高速液体クロマトグラフ（Hewlett Packard 1090）を用いて測定し、確認した。

2. 使用動物および飼育方法

日本チャールス・リバー（厚木飼育センター）のCrI:CD(SD)ラット（SPF）の雌雄を8週齢で購入した。導入日を含む7日間を検疫と馴化を兼ねて飼育し、投与前の雌の性周期を観察するために、さらに8日間の予備飼育を行った。これらの飼育期間中に状態の変化や異常な性周期がみられなかった動物から、投与開始日の体重の中央値に近い雄48匹と雌58匹（投与開始時体重範囲、雄：333～421g、雌：202～245g）を選定し、試験に用いた。

群分けは、動物を体重の重い順より各群に1匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の合計体重を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることで、群間の体重の偏りを小さくする方法（適正層別方式）により実施した。

動物は、温度；23±2℃、湿度；55±15%、換気回数；15～17回/時、明暗サイクル；12時間点灯（8:00～20:00）/12時間消灯（20:00～8:00）に制御された飼育室でステンレス製網ケージに個別に収容して飼育した。ただし、妊娠18日以降の母動物は、床敷（ALPHA-dri™：Shepherd Specialty Papers）をいれたステンレス製分娩用ケージに収容した。飼料（CRF-1 固型、30KGγ線照射滅菌、オリエンタル酵母工業）と飲料水（秦野市水道局供給の水道水をフィルターろ過した後、紫外線照射）は自由摂取としたが、解剖前日の夕方からは絶食させた。

3. 投与量の設定および投与方法

投与量は用量設定試験の結果に基づいて設定した。用量設定試験では1000 mg/kgを最高用量とし、以下、300 mg/kg、100 mg/kg、30 mg/kgに設定した。10週齢のCrI:CD(SD)ラット、1群あたり雌雄各5匹に、4,4'-ジアミノジフェニルエーテルを14日間、毎日、強制経口投与し、投与終了翌日に剖検した。その結果、1) 1000 mg/kg群では投与6日までに、300 mg/kg群では投与10日までに雌雄全例が死亡した。また、100 mg/kg群では投与11日までに雄3例が死亡した。なお、死因を特定することはできなかった。2) 100 mg/kg群には雌雄ともに体重の減少がみられ、雄では胸腺、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢重量の減少、雌では胸腺重量の減少および脾臓と副腎重量の増加が認められた。3) 血液学検査で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少および網赤血球比の増加が雌雄ともに30 mg/kg群から認められた。3) 血液生化学検査では総ビリルビン、

ASTおよびALTの増加が雌雄ともに30 mg/kg群から認められた。以上の結果から、本試験の高用量は雌雄に貧血がみられた30 mg/kgとし、以下、中用量を10 mg/kg、低用量を3 mg/kgに設定した。

本試験では対照群1群と投与群3群の計4群を設け、1群あたり雌雄各12匹の動物を用いた。なお、対照群と30 mg/kg群については、雄では12匹のうち各群5匹を回復動物とし、雌では交配をさせないサテライト動物（回復動物）として、各群5匹の雌を追加した。

各用量の投与検体は、雄には交配前14日間、交配期間14日間および交配期間終了後14日間の42日間、雌には交配前14日間、交配期間（交尾成立まで）、妊娠期間および哺育4日までの計42～55日間、サテライト雌には42日間、毎日午後に投与した。ただし、分娩中および午前中に分娩が確認された雌にはその日の投与はしなかった。

対照群と30 mg/kg群の雌雄の回復動物については、投与期間終了後14日間の回復期間を設けた。

4. 観察および検査（反復投与毒性）

1) 一般状態の観察

投与期間は毎日2回（投与前・後）、回復期間は毎日1回、一般状態を観察した。

2) 行動機能の観察

(1) 詳細観察

投与期間および回復期間に週1回の頻度で行動機能に関する詳細観察を行った。ただし、雌の投与6週の観察は、分娩および哺育時の動物への負荷を考慮してサテライト動物のみ行った。

詳細観察は、ケージから動物を取り出す際、ケージから動物を取り出した後および作業台上で実施した。ケージから動物を取り出す際には、接触反応・発声・取り出し易さを、ケージから動物を取り出した後には、扱い易さ・体温・被毛状態・皮膚の色・眼の状態・流涎の有無を、作業台上では、姿勢・活動性・警戒/探索行動・歩行状態・常同行動・呼吸・振戦/攣縮/痙攣の有無を観察し、1分間における排尿数・排糞数・身繕い数・洗顔数の計数も行った。

(2) 反応性検査、握力測定および自発運動量測定

反応性検査、握力測定および自発運動量測定ともに、雄は全例について投与6週に行った。雌は群毎に同一分娩日または分娩日の近い動物5匹を選定し、解剖前日（分娩4日後）に行った。自発運動量測定と握力測定は、雌雄ともに回復2週にも行った。

反応性検査は、視覚・聴覚・痛覚・瞳孔反射・空中正向反射について行った。

握力測定は握力測定装置（MK-380CM：室町機械）を用いて行った。測定は前肢・後肢ともに2回行い、平均値をその個体の値とした。

自発運動量測定は自発運動量測定装置（SCANET MV-10：メルクエスト）を用いて行った。測定時間は60

分間とした。

3) 体重測定

雄は投与 1・8・15・22・29・36・42 日および回復 1・8・14 日に体重を測定した。

雌は交配前の投与 1・8・15 日、妊娠 0・7・14・20 日および分娩日（哺育 0 日）と分娩 4 日後（哺育 4 日）に体重を測定した。サテライト雌は投与 1・8・15・22・29・36 日および回復 1・8・14 日に測定した。

解剖日には絶食後の体重（解剖時体重）を測定した。

4) 摂餌量測定

摂餌量は各測定期間に給餌量と残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日あたりの摂餌量を算出した。

雄の摂餌量は投与 1～8・8～15・29～36・36～42 日および回復 1～8・8～14 日に測定した。

雌の摂餌量は交配前の投与 1～8・8～15 日、妊娠 0～7・7～14・14～20 日および哺育 0～4 日に測定した。サテライト雌は投与 1～8・8～15・29～36・36～43 日および回復 1～8・8～14 日に測定した。

5) 尿検査

投与 6 週に雄とサテライト雌の新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティスティックス：バイエル）を用いて、pH・蛋白・グルコース・ケトン体・ビリルビン・潜血・ウロビリノーゲンを検査した。

6) 剖検

雄は最終投与日（投与 42 日）の翌日と回復 14 日の翌日に剖検した。分娩した雌は分娩 5 日後、分娩しなかった雌は妊娠 26 日相当日に、サテライト雌は回復 14 日の翌日に剖検した。

7) 血液学検査

解剖時にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管およびクエン酸ナトリウム入り採血管（凝固検査用）に採血した血液を用いて血液学検査を行った。赤血球数・血小板数・網赤血球比・平均赤血球容積(MCV)・白血球数（以上、光学的散乱法）、ヘモグロビン濃度（シアンメトヘモグロビン法）、ヘマトクリット値・平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)・平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)（以上、計算による）は総合血液学検査装置（ADVIA 120：バイエル）を用いて、白血球分類（ライト染色による）は血液細胞自動分類装置（MICROX HEG-120NA：オムロン）を用いて、プロトロンビン時間(PT)（Quick 一段法）と活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)（エラジン酸活性化法）は全自動血液凝固測定装置（Sysmex CA-5000：シスメックス）を用いて検査した。

8) 血液生化学検査

解剖時にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られ

た血漿について、総蛋白（ビウレット法）、アルブミン（BCG 法）、A/G 比（計算による）、総ビリルビン（アゾビリルビン法）、グルコース（GlcK・G-6-PDH 法）、総コレステロール（CE・COD・POD 法）、トリグリセリド(MGLP・GK・GPO・POD 法)、リン脂質(PLD・ChOD・POD 法)、AST・ALT・ γ -GTP・CK（以上、JSCC 法）、LDH（SFBC 法）、ALP（GSCC 法）、BUN（ウレアーゼ・GLDH 法）、クレアチニン（Jaffé 法）、ナトリウム・カリウム・クロール（以上、イオン選択電極法）、カルシウム（OCPC 法）および無機リン（PNP・XOD・POD 法）を自動分析装置（日立 7080：日立製作所）を用いて検査した。

9) 器官重量

胸腺・副腎・心臓・腎臓・脾臓・肝臓・脳・精巣・精巣上体・甲状腺・下垂体の湿重量（絶対重量）を測定した。また、各器官の絶対重量の解剖時体重に対する百分率（相対重量）を算出した。

10) 病理組織学検査

雄の精巣・精巣上体・精囊・凝固腺・前立腺（腹葉）および雌の卵巣は全動物で検査した。また、雌雄の各群 5 匹（動物番号の小さい順）、回復動物および死亡動物については、気管・肺・骨髄（大腿骨）・リンパ節（腋窩・鼠径等）・胸腺・脾臓・心臓・胃・小腸・大腸・肝臓・腎臓・膀胱・下垂体・甲状腺・上皮小体・副腎・子宮（回復動物）・陰・乳腺・脳・脊髄・末梢神経（坐骨神経）・筋肉・骨（大腿骨）を検査した。上記の組織を 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液またはブアン溶液（精巣・精巣上体のみ）で固定後、パラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色した標本について光学顕微鏡で観察した。

5. 観察および検査（生殖発生毒性）

1) 性周期の観察

投与開始日から交配開始日までの毎朝、雌動物（サテライト動物は除く）の陰垢を採取・塗抹し、ギムザ染色した標本について観察した。

性周期は発情前期、発情期および発情休止期に分類し、発情期が 4 日から 6 日の間隔で回帰される例を正常とした。また、性周期の観察期間に 2 回以上の性周期が得られた動物について平均性周期を算出した。

2) 交配

交配は投与 15 日の夕方から交尾が確認されるまで、14 日間を限度として、同一群内の雌雄 1 匹ずつを同居させる方法で行った。交尾の確認は毎朝、陰内の陰栓または陰垢中の精子の存在を調べることににより行い、これらが確認された日を妊娠 0 日と規定した。

交配の結果から、交尾所要日数（交配開始から交尾成立までに要した日数）と交尾率〔（交尾成立ペア数／交配ペア数）×100〕を算出した。

3) 分娩

分娩の確認は、妊娠 20 日から 25 日を限度に 1 日 2 回行い、16 時の時点で分娩が終了していた動物についてはその日を分娩日（哺育 0 日）と規定した。分娩中の動物については分娩状態を観察した。

これらの結果から、妊娠期間（妊娠日から分娩日までの日数）・受胎率〔（受胎動物数／交尾成立ペア数）×100〕・出産率〔（生児出産動物数／受胎動物数）×100〕を算出した。

4) 妊娠黄体数および着床痕数

解剖時に卵巣を摘出して実体顕微鏡により妊娠黄体を計数した。また、子宮は摘出して 10% 硫化アンモニウム溶液で染色し、翌日に着床痕を計数した。

これらの結果から、着床率〔（着床痕数／妊娠黄体数）×100〕を算出した。

分娩しなかった雌で着床痕がみられなかった場合は不妊とした。

5) 児動物の観察・検査

(1) 数、性、外表および一般状態の観察

出生時（哺育 0 日）に、産児（生存児・死亡児）の計数、性別確認および外表観察を行った。その後、哺育 4 日まで毎日、一般状態観察と児動物数の確認を行った。

これらの結果から、分娩率〔（産児数／着床痕数）×100〕・出生率〔（哺育 0 日の生存児数／着床痕数）×100〕・哺育 0 日の生存率〔（哺育 0 日の生存児数／産児数）×100〕・哺育 4 日の生存率〔（哺育 4 日の生存児数／哺育 0 日の生存児数）×100〕および性比（雄の児数／雌雄の児数）を算出した。

(2) 体重

哺育 0 日と哺育 4 日に、母動物（腹）毎に雌雄単位でまとめた体重を測定し、児動物 1 匹あたりの平均値を算出した。

(3) 剖検

全ての児動物を剖検した。哺育 4 日まで生存した児動物は、エーテル麻酔下で開腹後、腹大動脈切断により放血死させた。死亡児は死亡発見日に剖検した。

6. 統計解析

交尾率・受胎率・出産率および尿検査と病理組織学検査で得られた数値データは、対照群と各投与群間で χ^2 検定を行った。

その他の検査で得られた数値データは、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重比較を行った。回復動

物における数値データは、まず、F 検定を行い、分布の違いが認められなかった場合は Student の t 検定を、分布の違いが認められた場合は Aspin-Welch の t 検定を用いて統計処理を行った。

各検定は 5% および 1% の有意水準で両側検定を行った。

結果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態

30 mg/kg 群の雌 4 例が死亡した（3 例は妊娠 23 日に、1 例は妊娠 24 日に死亡）。死亡前の状態異常として体温低下（4 例）、蒼白（3 例）、鼻孔周囲の赤色分泌物付着（1 例）、膣口からの出血（1 例）が観察されたが、それまでの一般状態に異常はみられていなかった。

雄および 3 mg/kg 群と 10 mg/kg 群の雌には死亡はなく、一般状態に投与の影響は認められなかった。

2) 行動機能観察

(1) 詳細観察

雌雄の行動機能に関する詳細観察結果に投与の影響は認められなかった。

(2) 反応性検査

雌雄の反応性に投与の影響は認められなかった。

(3) 握力 (Table 1)

雌雄の握力に投与の影響は認められなかった。

(4) 自発運動量 (Table 2)

雄の自発運動量に投与の影響は認められなかった。

30 mg/kg 群の雌に自発運動量の増加が認められた。回復期間終了時に測定した 30 mg/kg 群のサテライト雌には本所見はみられなかった。

10 mg/kg 群の雌で、測定途中の 10 分間の自発運動量が統計学的に有意な増加を示したが、60 分間の自発運動量には有意差がみられないことから投与の影響と判断しなかった。

3) 体重 (Fig. 1~3)

雌雄の体重に投与の影響は認められなかった。

4) 摂餌量 (Fig. 4~6)

30 mg/kg 群では雄の投与 1~8 日の摂餌量とサテライト雌の投与 36~43 日の摂餌量に減少が認められた。

3 mg/kg 群と 10 mg/kg 群の雌雄の摂餌量に投与の影響は認められなかった。

5) 尿検査 (Table 3)

雌雄の尿検査結果に投与の影響は認められなかった。

10 mg/kg 群の雄に尿蛋白の減少がみられたが、30

mg/kg 群にはみられず、投与量に対応していないことから投与の影響と判断しなかった。

6) 血液学検査 (Table 4)

10 mg/kg 群と 30 mg/kg 群の雄に赤血球数とヘモグロビン濃度の減少および網赤血球比の増加が認められた。さらに、30 mg/kg 群にはヘマトクリット値と MCHC の減少、APTT の短縮および白血球数の増加が認められた。回復期間終了時の検査では 30 mg/kg 群の雄に赤血球数、ヘモグロビン濃度、MCHC、好酸球比の減少、網赤血球比の増加および PT の短縮が認められた。

30 mg/kg 群の雌には赤血球数と MCHC の減少（赤血球数に統計学的な有意差はない）、網赤血球比の増加および PT の延長が認められた。回復期間終了時の検査では 30 mg/kg 群のサテライト雌に赤血球数、ヘモグロビン濃度および好酸球比の減少が認められた。

3 mg/kg 群の雌雄および 10 mg/kg 群の雌の血液学検査結果に投与の影響は認められなかった。

7) 血液生化学検査 (Table 5)

10 mg/kg 群と 30 mg/kg 群の雄に総ビリルビンの増加が認められた。さらに、30 mg/kg 群の雄には AST、ALT、ALP の増加およびリン脂質の減少が認められた。雌には 30 mg/kg 群に A/G 比の減少が認められた。雌雄にみられたこれらの所見は回復期間終了時の検査では認められなかった。

3 mg/kg 群の雌雄および 10 mg/kg 群の雌の血液生化学検査結果に投与の影響は認められなかった。

3 mg/kg 群の雄に AST の増加がみられた。AST の増加は 30 mg/kg 群にみられたが 10 mg/kg 群にはないことから投与の影響と判断しなかった。また、回復期間終了時の検査で雄の 30 mg/kg 群に A/G 比の増加と総ビリルビンの減少がみられ、サテライト雌の 30 mg/kg 群にカルシウムの減少がみられたが、何れの所見も投与期間終了時の検査ではない軽微な変化であることから投与の影響と判断しなかった。

8) 病理学検査

(1) 剖検所見

30 mg/kg 群の雄 4 例に甲状腺の肥大が認められた。また、10 mg/kg 群の雄 2 例には精巣上体の結節（片側性）が観察された。

雌には剖検による肉眼病変は観察されなかった。

(2) 器官重量 (Table 6, 7)

30 mg/kg 群の雄に甲状腺および脾臓の絶対重量と相対重量の増加が認められた。回復期間終了時の検査では、脾臓重量の増加はみられなくなったが、甲状腺の絶対重量と相対重量の増加はまだ認められていた。雌では 30 mg/kg 群に甲状腺と肝臓の相対重量の増加および胸腺の絶対重量と相対重量の減少が認められた。回復期間終了時の検査では 30 mg/kg 群のサテライト雌にこれらの所見はみられなかったが、脾臓の相対重量に増加が認めら

れた。

3 mg/kg 群と 10 mg/kg 群の雌雄の器官重量に投与の影響は認められなかった。

(3) 病理組織学検査 (Table 8)

雄の病理組織所見

投与の影響が肝臓、脾臓および甲状腺に認められた。

肝臓（各群 5 例検査）：小葉中心性の肝細胞肥大が 30 mg/kg 群の 5 例に認められた。肥大した肝細胞は周囲の細胞に比較して好塩基性がやや減弱していた。また、30 mg/kg 群には肉芽の形成が 4 例に認められた。肉芽の形成部位には肝細胞の壊死がみられる例もあった。両所見は回復期間終了時の検査でも認められた。

脾臓（各群 5 例検査）：髄外造血巣の増加が 30 mg/kg 群の 5 例に認められた。また、ヘモジデリン沈着の増加が 10 mg/kg 群の 1 例と 30 mg/kg 群の 5 例に認められた。回復期間終了時の検査では髄外造血巣の増加はみられなくなったが、ヘモジデリン沈着の増加は認められた。

甲状腺（各群 5 例検査）：濾胞増生（過形成）が 30 mg/kg 群の 5 例に認められた。本所見は回復期間終了時の検査でも認められた。

全投与群に肝小葉中心性の肝細胞の脂肪化がみられたが、投与量に対応した発生数ではないことから投与の影響と判断しなかった。また、30 mg/kg 群で前立腺の炎症の発生数に減少がみられたが、病変の減少であり毒性的意義はないと判断した。

剖検時に 10 mg/kg 群の 2 例にみられた精巣上体の結節は、精子性肉芽腫と診断された。投与量に対応した発生数ではなく、偶発的にみられる病変であることから投与の影響と判断しなかった。

雌の病理組織所見

死亡例 (30 mg/kg 群の 4 例)

死亡した 4 例には、胸腺の核崩壊（重度）、脾臓のヘモジデリン沈着（中等度）および萎縮（軽度 1 例、中等度 3 例）が観察された。また、1 例の肝臓に限局性の巣状壊死（軽度）、2 例の肺に泡沫細胞出現（軽度）が認められた。

生存例

投与の影響が肝臓と脾臓に認められた。

肝臓（各群 5 例検査）：小葉中心性の肝細胞肥大が 30 mg/kg 群の 5 例に認められた。また、肉芽の形成が 30 mg/kg 群の 5 例に認められた。1 例では肉芽の形成部位に肝細胞の壊死がみられた。回復期間終了時の検査では 30 mg/kg 群のサテライト雌に小葉中心性の肝細胞肥大が 1 例、肉芽形成の増加が 5 例に認められた。

脾臓（各群 5 例検査）：ヘモジデリン沈着の増加が 30 mg/kg 群の 5 例に認められた。

回復期間終了時の検査では、ヘモジデリン沈着は対照群、30 mg/kg 群ともに全例に同程度で認められた。

2. 生殖発生毒性

1) 性周期 (Table 9)

性周期に投与の影響は認められなかった。

対照群の1例は発情期が4日から6日の間隔で回帰せず、休止期が持続したため異常性周期とした。

2) 交配成績 (Table 9)

交尾率、交尾所要日数および受胎率に差はなく、交配成績に投与の影響は認められなかった。

3 mg/kg 群の1例は妊娠25日相当日になっても分娩がみられなかったため、その翌日に解剖した結果、妊娠黄体と着床痕が認められなかったことから不妊動物とした。本例には性周期の異常や卵巣病変はなく、交配相手の雄の精巣・精巣上体等に異常病変がないことから不妊は偶発的な結果と判断した。

3) 妊娠および分娩 (Table 9, 10)

30 mg/kg 群の4例が妊娠23日(3例)または24日(1例)に未分娩のまま死亡した。

3 mg/kg 群と10 mg/kg 群の妊娠中および分娩中の母動物の状態、妊娠期間および出産率に投与の影響は認められなかった。

4) 妊娠黄体数および着床痕数 (Table 10)

妊娠黄体数、着床痕数および着床率に投与の影響は認められなかった。

5) 児動物および哺育 (Table 10)

(1) 出生日

30 mg/kg 群では産児数と出生児数が減少し、分娩率と、出生率に低下傾向がみられ、生存率は低下、さらに雌雄児の体重減少が認められた。また、3例(2腹)の出生児には黄疸が観察された。

3 mg/kg 群と10 mg/kg 群では産児数、生存児数、分娩率、出生率、生存率、性比および体重に投与の影響は認められず、また、投与の影響が示唆される外表異常は認められなかった。

(2) 哺育期間

30 mg/kg 群の哺育4日の生存児数が出生日に比較してさらに減少し、生存率に低下が認められた。性比に変化はみられなかった。また、哺育4日まで生存した雌雄の体重は対照群との差がなくなった。状態観察において30 mg/kg 群の13例(6腹)に黄疸、11例(1腹)に瘦削が認められた。なお、母動物に哺育不全は認められなかった。

3 mg/kg 群と10 mg/kg 群では母動物の哺育状況、児の一般状態、哺育4日の生存児数、生存率、性比および体重に投与の影響は認められなかった。

(3) 剖検

30 mg/kg 群の児動物7例(4腹)に黄疸が認められた。

3 mg/kg 群と10 mg/kg 群では投与の影響が示唆され

る肉眼所見は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

4,4'-ジアミノジフェニルエーテルは雌雄ラットに肝臓癌や甲状腺癌を発生させることが報告されている。また、一般毒性としては、甲状腺肥大や下垂体の過形成、精細管の変性、前立腺の萎縮がみられたと報告されている¹⁾。本試験では肝臓、甲状腺および赤血球に投与の影響がみられたが、下垂体、精巣および前立腺に異常は認められなかった。

30 mg/kg 群の雌4例が妊娠末期に死亡した(3例は妊娠23日、1例は妊娠24日)。死亡する直前に体温低下、蒼白、鼻血性分泌物等の異常が観察されたが、それまでは体重の推移を含めて異常は観察されなかった。剖検や病理組織検査では死因に結びつく病変は認められなかった。生存例の一般状態に異常はみられず、30 mg/kg 群の雌雄には一時的な摂餌量の減少が観察されたが、体重への影響は認められなかった。

30 mg/kg 群の雌雄の肝臓に、小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。また、肉芽の形成が増加し、形成部位に肝細胞壊死を伴っている例も観察された。これらの肝臓病変は回復期間終了時の雌雄にも認められた。肝臓への影響を示唆する血液生化学所見として、30 mg/kg 群の雄にAST、ALT、ALPの増加がみられた。雌にこれらの所見は認められなかった。肝細胞肥大がみられたにもかかわらず、肝臓重量の増加は30 mg/kg 群の雌の相対重量にみられたのみであった。以上の結果から、本試験でみられた肝臓に関する所見は、薬物代謝酵素誘導作用による適応性の変化ではなく毒性影響と考える。なお、1例の死亡動物に限局性の巣状壊死がみられたが、肝細胞肥大や肉芽の形成との関連は不明であった。

剖検時に30 mg/kg 群の雄で甲状腺の肥大が観察された。甲状腺重量は増加し、病理組織学検査で濾胞増生(過形成)が認められた。雌では重量増加はみられたが濾胞増生については対照群との区別がつかなかった。濾胞細胞の過形成はポリ塩化ビフェニル(PCB)などの甲状腺ホルモン分解酵素を誘導する物質をラットに投与すると認められる。そのメカニズムは甲状腺ホルモンの血中濃度が減少するために甲状腺刺激ホルモン(TSH)の産生が増加、そしてTSHの甲状腺への継続刺激により濾胞細胞の過形成が誘発される²⁾。甲状腺の濾胞増生は4,4'-ジアミノジフェニルエーテルの103週間の混餌投与試験で、雌雄ラットにみられた甲状腺癌の発生と関連があると考えられ¹⁾、本試験では雌雄の30 mg/kg 群にみられた甲状腺重量の増加を濾胞増生によるものと考え有害影響と判断する。

4,4'-ジアミノジフェニルエーテルの投与により雄では10 mg/kg から、雌では30 mg/kg に溶血性貧血が認められた。血液学検査で、赤血球数の減少と網赤血球比の増加が雄には10 mg/kg から、雌では30 mg/kg に認めら

れた。また、血液生化学検査で雄の 30 mg/kg に総ビリルビンの増加がみられた。さらに雌雄の 30 mg/kg には脾臓重量の増加があり、病理組織学検査でヘモジデリン沈着と髄外造血巣の増加が観察され、赤血球の溶血・破壊が増加したことを示していた。

雌の 30 mg/kg 群の出産雌に自発運動量の増加がみられたが、その意味については不明であった。

2. 生殖発生毒性

性周期や交配能力に投与の影響は認められなかった。しかし、30 mg/kg 群の雌 4 例が妊娠末期に死亡した。子宮内に残存していた胎児は剖検時には死亡しており、外表異常はなく、胎児の大きさから子宮内では順調に発育していたと考えられる。同用量群の他の動物では順調に分娩が完了しており、分娩できずに死亡した原因については不明であるが、4,4'-ジアミノジフェニルエーテルに分娩障害作用があることが示唆された。

30 mg/kg 群の出生児に黄疸が観察され、生後 4 日までの哺育期間中に発生数は増加した。親動物に溶血性貧血や肝臓毒性がみられていることから、4,4'-ジアミノジフェニルエーテルの胎盤および乳汁移行により児動物にも同様な有害影響が生じた可能性が考えられる。黄疸のみられた児動物が死亡した結果、30 mg/kg 群の児動物の生存率は低下した。したがって、4,4'-ジアミノジフェニルエーテルは児動物にも有害な影響を及ぼす化合物であることが示唆された。

3. 無作用量 (NOEL: No Observed Effect Level)

反復投与毒性に関して、NOEL 決定のエンドポイントを、雄では 10 mg/kg の用量からみられた貧血所見とし、雌では 30 mg/kg の用量でみられた死亡とした。また、生殖発生毒性に関しては、30 mg/kg の用量でみられた妊娠末期の死亡および児動物の死亡増加とした。

従って、本試験における 4,4'-ジアミノジフェニルエーテルの NOEL は、反復投与毒性に関しては雄では 3 mg/kg/day、雌では 10 mg/kg/day と結論される。また、生殖発生毒性に関しては 10 mg/kg/day であると結論される。

4. 無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

反復投与毒性に関して、NOAEL 決定のエンドポイントを、雄では 10 mg/kg の用量からみられた貧血所見とし、雌では 30 mg/kg の用量でみられた死亡とした。また、生殖発生毒性に関しては、30 mg/kg の用量でみられた妊娠末期の死亡および児動物の死亡増加とした。

従って、本試験における 4,4'-ジアミノジフェニルエーテルの NOAEL は、反復投与毒性に関しては雄では 3 mg/kg/day、雌では 10 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しては 10 mg/kg/day であると結論される。

文献

- 1) National Cancer Institute (NCI). 1980. Bioassay of 4,4'-oxydianiline for possible carcinogenicity (Technical report series No. 205).
- 2) 毒性病理学. 1994. 伊東信行 編著. 東京, 中山書店.

連絡先

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター
〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445
Tel 0463-82-3911 Fax 0463-82-3860

Correspondence

Japan Bioassay Research Center, Japan
Industrial Safety and Health Association
2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257-0015,
Japan
Tel +81-463-82-3911 Fax +81-463-82-3860

本報告書は、平成 20 年度ハザードデータ評価委員会（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）で評価後、修正・加筆された。

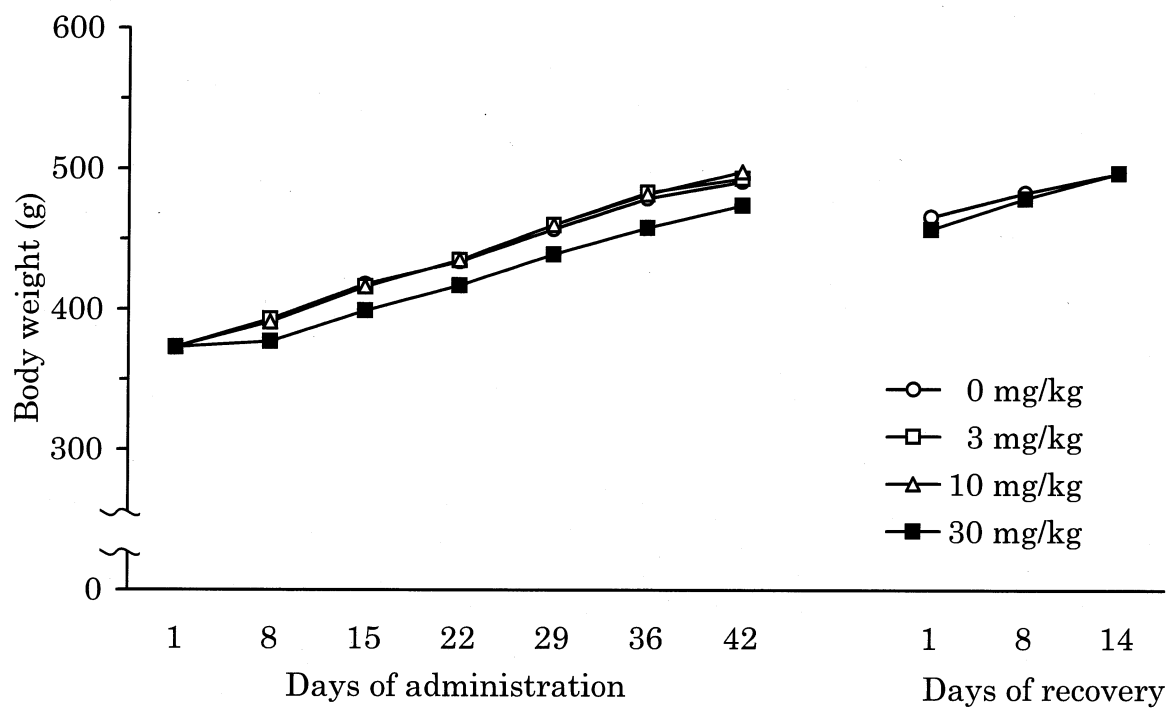


Figure 1 Body weight changes of male rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

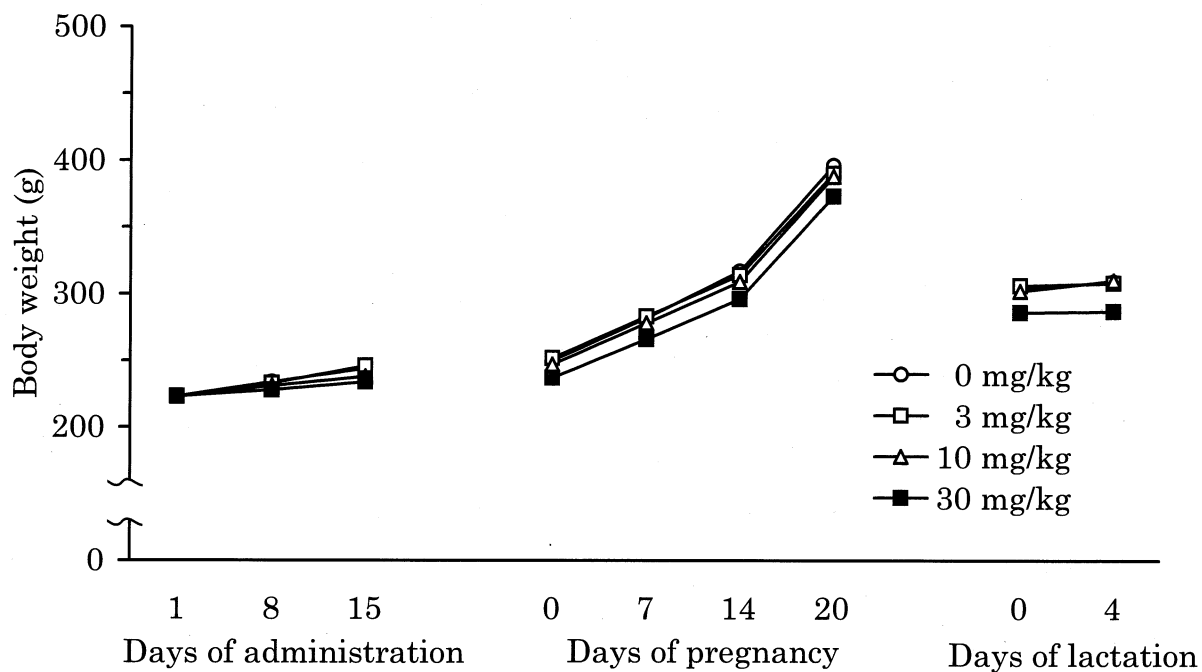


Figure 2 Body weight changes of female rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

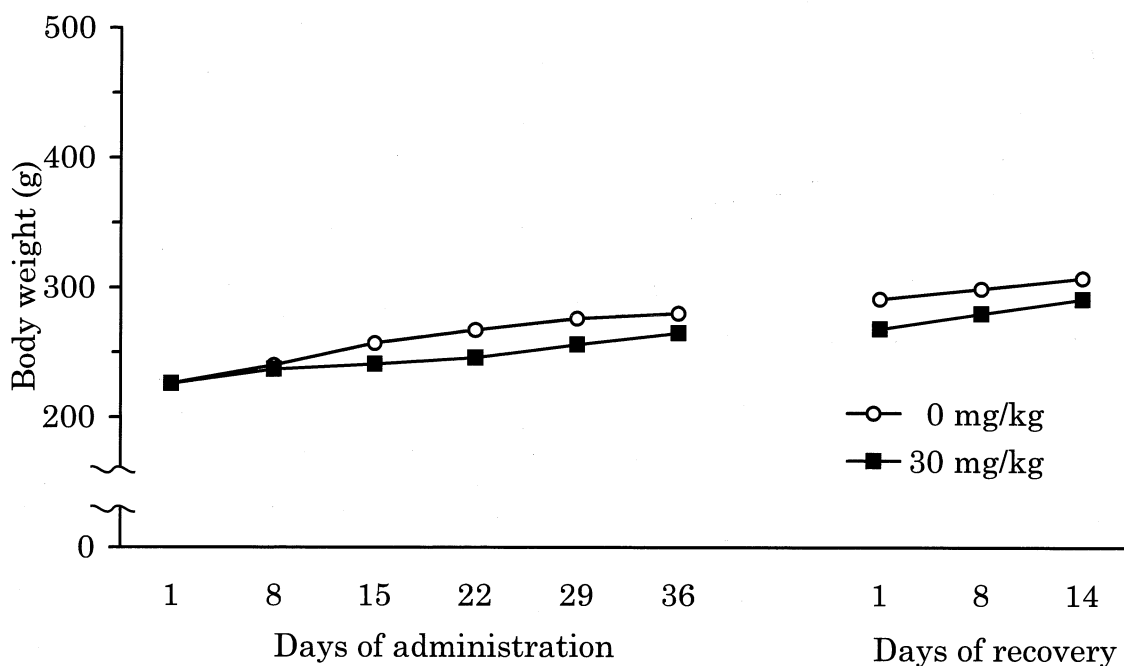


Figure 3 Body weight changes of satellite female rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

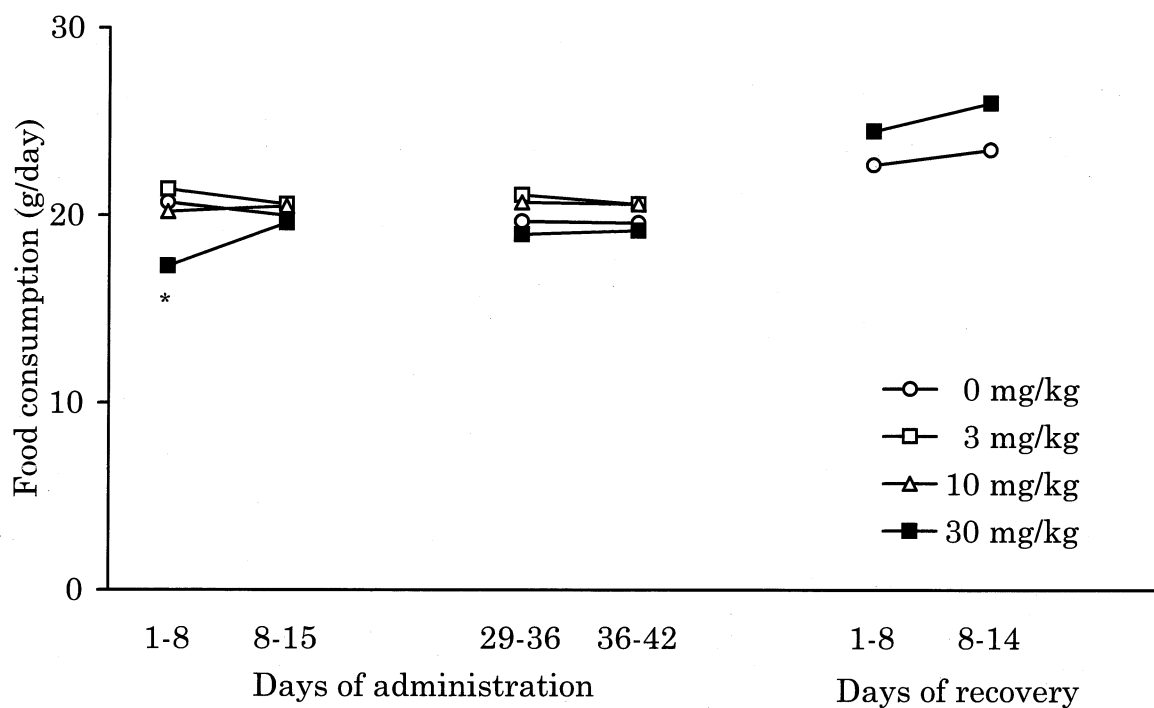


Figure 4 Food consumption changes of male rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test. Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$.

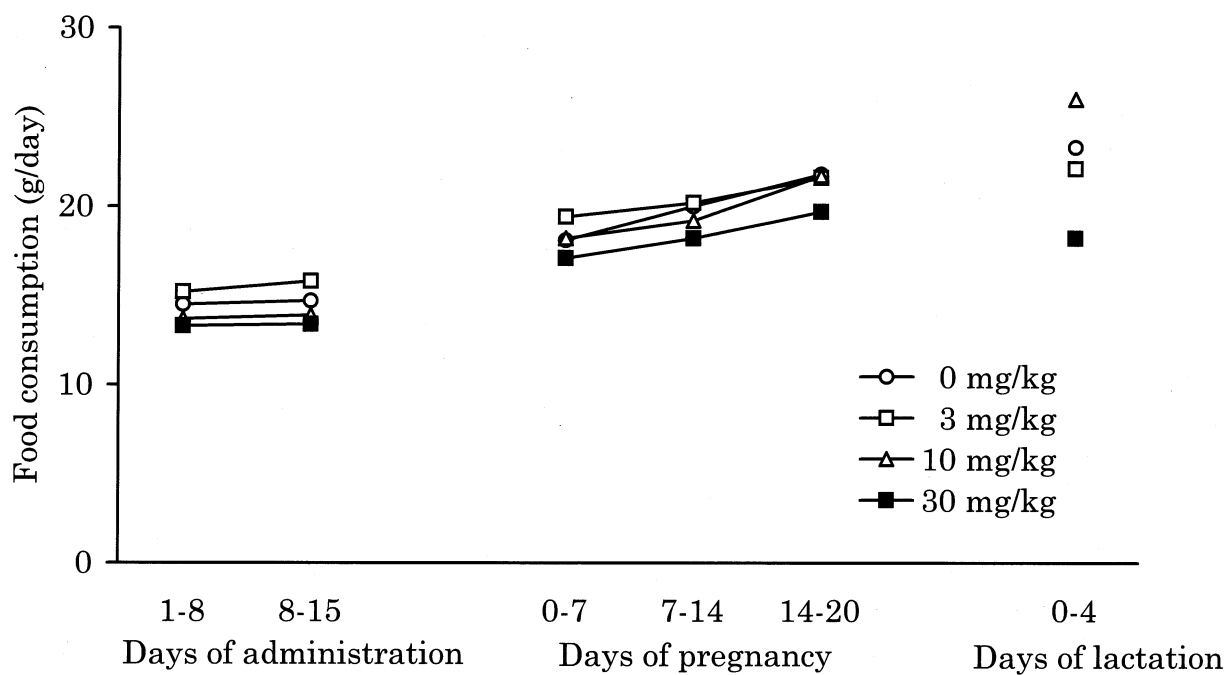


Figure 5 Food consumption changes of female rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

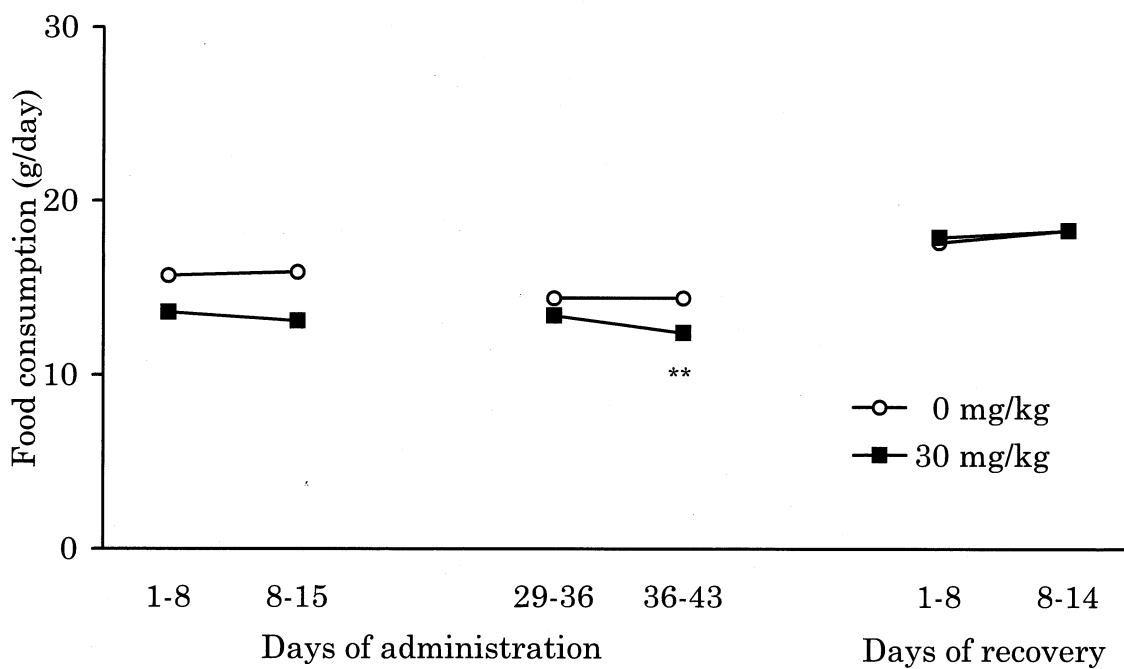


Figure 6 Food consumption changes of satellite female rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test. Significant difference from the control group, ** $p \leq 0.01$.

Table 1 Grip strength of rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
	0	3	10	30	0	30
Male						
No. of animals examined	12	12	12	12	5	5
Forelimb grip strength (g)	456 ± 91	436 ± 147	424 ± 124	347 ± 106	456 ± 118	386 ± 89
Hindlimb grip strength (g)	232 ± 48	253 ± 85	214 ± 49	215 ± 55	257 ± 76	239 ± 72
Female (dam)						
No. of animals examined	5	5	5	5	Satellite female	
					5	5
Forelimb grip strength (g)	294 ± 66	280 ± 41	273 ± 30	239 ± 49	257 ± 47	218 ± 24
Hindlimb grip strength (g)	167 ± 57	174 ± 37	195 ± 37	134 ± 21	163 ± 40	149 ± 25

Data represent mean ± S.D.

Table 2 Locomotor activity of rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
	0	3	10	30	0	30
Male						
No. of animals examined	12	12	12	12	5	5
Interval count						
0 – 10 (min)	2272 ± 752	2815 ± 922	3079 ± 1211	3176 ± 1088	1612 ± 800	2226 ± 503
10 – 20 (min)	1603 ± 791	1590 ± 965	2097 ± 1062	2220 ± 1071	1097 ± 705	1614 ± 659
20 – 30 (min)	1056 ± 560	1087 ± 961	1514 ± 913	1574 ± 1216	888 ± 675	729 ± 719
30 – 40 (min)	569 ± 627	533 ± 896	790 ± 781	1033 ± 983	423 ± 409	428 ± 581
40 – 50 (min)	299 ± 385	760 ± 746	665 ± 735	338 ± 532	133 ± 41	521 ± 660
50 – 60 (min)	427 ± 421	246 ± 284	200 ± 413	227 ± 503	22 ± 22	564 ± 893
Total count						
0 – 60 (min)	6227 ± 2054	7030 ± 3529	8345 ± 4482	8567 ± 3146	4175 ± 1965	6081 ± 2321
Female (dam)						
No. of animals examined	5	5	5	5	Satellite female 5	5
Interval count						
0 – 10 (min)	1101 ± 964	1314 ± 818	2701 ± 353 *	2390 ± 722 *	2771 ± 603	2677 ± 331
10 – 20 (min)	949 ± 859	624 ± 544	1837 ± 951	2079 ± 352	2148 ± 1252	2082 ± 999
20 – 30 (min)	535 ± 561	518 ± 461	1271 ± 1480	1678 ± 1067	1556 ± 1148	1583 ± 152
30 – 40 (min)	60 ± 53	168 ± 268	748 ± 1086	1449 ± 941	1188 ± 942	1611 ± 985
40 – 50 (min)	314 ± 609	16 ± 20	492 ± 560	1010 ± 903	1182 ± 891	982 ± 1068
50 – 60 (min)	566 ± 774	51 ± 104	611 ± 980	1548 ± 1013	1054 ± 614	679 ± 667
Total count						
0 – 60 (min)	3524 ± 2071	2692 ± 1881	7660 ± 4065	10153 ± 3379 **	9900 ± 4669	9615 ± 2127

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$.

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		0	3	10	30
Male					
No. of animals examined		12	12	12	12
pH	7.5	0	0	1	0
	8.0	2	2	4	3
	8.5	10	10	7	9
Protein	+	5	7	10	4
	2+	7	5	2	8
Glucose		12	12	12	12
Ketone body	—	1	1	3	1
	±	8	9	8	7
	+	3	2	1	4
Bilirubin		12	12	12	12
Occult blood		12	12	12	12
Urobilinogen		12	12	12	12
Satellite female					
No. of animals examined		5	-	-	5
pH	6.0	0	-	-	1
	6.5	0	-	-	0
	7.0	0	-	-	0
	7.5	0	-	-	1
	8.0	0	-	-	0
	8.5	5	-	-	3
Protein	±	1	-	-	0
	+	2	-	-	4
	2+	2	-	-	1
Glucose		5	-	-	5
Ketone body		5	-	-	5
Bilirubin		5	-	-	5
Occult blood		5	-	-	5
Urobilinogen		5	-	-	5

Grade; —: negative, ±: trace, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

Data represent the number of animals.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$.

Table 4 Hematology of rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	3	10	30	0	30
Male						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.49 \pm 0.29	8.49 \pm 0.31	8.10 \pm 0.35 *	7.25 \pm 0.34 **	8.53 \pm 0.10	7.94 \pm 0.32 *
Hemoglobin (g/dL)	16.1 \pm 0.9	15.8 \pm 0.6	15.4 \pm 0.5 *	13.7 \pm 0.5 **	16.0 \pm 0.9	14.9 \pm 0.3 *
Hematocrit (%)	42.6 \pm 2.3	42.2 \pm 1.1	41.1 \pm 1.5	37.5 \pm 1.1 **	42.7 \pm 2.8	40.7 \pm 1.1
MCV (fL)	50.2 \pm 2.6	49.7 \pm 0.9	50.8 \pm 1.7	51.8 \pm 2.4	50.0 \pm 3.0	51.3 \pm 1.6
MCH (pg)	19.0 \pm 1.0	18.6 \pm 0.3	19.0 \pm 0.6	18.9 \pm 0.8	18.7 \pm 0.9	18.7 \pm 0.7
MCHC (g/dL)	37.9 \pm 0.5	37.5 \pm 0.5	37.4 \pm 0.5	36.6 \pm 0.5 **	37.4 \pm 0.4	36.5 \pm 0.5 *
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	920 \pm 92	1028 \pm 98	1001 \pm 101	925 \pm 95	974 \pm 71	995 \pm 99
Reticulocyte (%)	1.7 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3	2.6 \pm 0.4 **	4.0 \pm 1.2 **	1.8 \pm 0.3	2.5 \pm 0.5 *
PT (sec)	14.4 \pm 2.7	15.9 \pm 3.1	15.2 \pm 3.8	13.5 \pm 0.6	16.7 \pm 2.3	13.8 \pm 1.1 *
APTT (sec)	23.2 \pm 1.8	23.0 \pm 2.2	22.2 \pm 2.0	19.4 \pm 1.1 **	22.2 \pm 1.2	21.6 \pm 1.6
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	12.25 \pm 1.32	12.98 \pm 2.02	14.11 \pm 2.83	17.27 \pm 2.41 **	10.82 \pm 2.28	14.08 \pm 5.43
Differential WBC (%)						
Neutrophil, band	0 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	0 \pm 0	0 \pm 0
Neutrophil, segment	18 \pm 9	20 \pm 5	19 \pm 6	21 \pm 7	19 \pm 6	17 \pm 6
Eosinophil	1 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 1	0 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1 *
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	4 \pm 1	4 \pm 1	4 \pm 2	6 \pm 2	5 \pm 1	4 \pm 2
Lymphocyte	77 \pm 9	73 \pm 5	75 \pm 7	72 \pm 7	75 \pm 6	79 \pm 6
Others	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Female (dam)						
No. of animals examined	12	11	12	8	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.40 \pm 0.67	6.27 \pm 0.36	6.41 \pm 0.45	5.86 \pm 0.45	8.00 \pm 0.23	7.37 \pm 0.33 **
Hemoglobin (g/dL)	13.0 \pm 1.0	12.5 \pm 0.7	13.2 \pm 0.8	12.2 \pm 0.7	15.3 \pm 0.5	14.0 \pm 0.9 *
Hematocrit (%)	35.2 \pm 1.9	33.7 \pm 1.5	35.5 \pm 1.7	34.1 \pm 1.8	39.5 \pm 1.2	37.4 \pm 2.2
MCV (fL)	55.3 \pm 3.9	53.8 \pm 2.6	55.5 \pm 2.6	58.3 \pm 2.4	49.4 \pm 2.1	50.7 \pm 1.1
MCH (pg)	20.4 \pm 1.1	20.0 \pm 0.9	20.6 \pm 1.0	20.8 \pm 0.8	19.1 \pm 0.8	19.1 \pm 0.8
MCHC (g/dL)	36.9 \pm 1.0	37.1 \pm 0.8	37.1 \pm 0.6	35.7 \pm 0.7 **	38.7 \pm 0.8	37.6 \pm 0.9
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1409 \pm 288	1364 \pm 238	1248 \pm 188	1289 \pm 124	1135 \pm 83	1047 \pm 176
Reticulocyte (%)	7.4 \pm 3.8	6.3 \pm 1.8	6.8 \pm 1.6	10.1 \pm 2.5 *	1.7 \pm 0.3	1.8 \pm 0.2
PT (sec)	12.0 \pm 0.2	11.9 \pm 0.2	12.0 \pm 0.2	12.4 \pm 0.4 **	11.5 \pm 0.5	11.9 \pm 0.4
APTT (sec)	16.7 \pm 1.4	16.9 \pm 1.5	17.0 \pm 1.5	17.2 \pm 1.1	16.0 \pm 2.0	17.2 \pm 0.5
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11.82 \pm 3.80	11.45 \pm 2.18	12.11 \pm 1.10	11.50 \pm 3.20	6.59 \pm 2.69	7.16 \pm 2.36
Differential WBC (%)						
Neutrophil, band	1 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1
Neutrophil, segment	29 \pm 6	28 \pm 6	30 \pm 7	31 \pm 8	13 \pm 5	19 \pm 9
Eosinophil	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 0	1 \pm 1 *
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	4 \pm 1	4 \pm 2	5 \pm 2	5 \pm 2	5 \pm 1	5 \pm 2
Lymphocyte	65 \pm 7	64 \pm 8	63 \pm 7	60 \pm 9	80 \pm 5	72 \pm 8
Others	0 \pm 0	1 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 3	0 \pm 0	1 \pm 1
Satellite female						

Data represent mean \pm S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$.

Table 5 Biochemistry of rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	3	10	30	0	30
Male						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
Total protein (g/dL)	6.4 ± 0.4	6.3 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.7 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1
A/G ratio	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1 *
Total bilirubin (mg/dL)	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.01 **	0.17 ± 0.03 **	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.01 *
Glucose (mg/dL)	165 ± 12	172 ± 14	171 ± 27	153 ± 14	172 ± 7	172 ± 10
Total cholesterol (mg/dL)	55 ± 4	53 ± 10	52 ± 9	45 ± 10	53 ± 10	48 ± 4
Triglyceride (mg/dL)	60 ± 16	55 ± 25	64 ± 29	36 ± 17	40 ± 21	49 ± 32
Phospholipid (mg/dL)	100 ± 8	100 ± 16	100 ± 10	83 ± 11 *	90 ± 8	89 ± 7
AST (IU/L)	57 ± 5	66 ± 9 *	64 ± 5	79 ± 6 **	66 ± 13	76 ± 9
ALT (IU/L)	26 ± 3	28 ± 5	27 ± 2	33 ± 3 **	24 ± 3	29 ± 6
LDH (IU/L)	104 ± 48	138 ± 82	112 ± 61	108 ± 55	105 ± 36	127 ± 72
ALP (IU/L)	238 ± 42	259 ± 39	273 ± 53	346 ± 57 **	212 ± 31	191 ± 20
γ-GTP (IU/L)	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1
CK (IU/L)	95 ± 15	102 ± 22	94 ± 17	86 ± 13	99 ± 18	117 ± 21
BUN (mg/dL)	10.7 ± 1.3	11.1 ± 0.9	10.9 ± 1.2	10.9 ± 1.4	12.1 ± 1.6	13.6 ± 1.5
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Na (mEq/L)	143 ± 1	143 ± 1	143 ± 1	142 ± 1	143 ± 2	142 ± 1
K (mEq/L)	3.8 ± 0.3	3.6 ± 0.2	3.8 ± 0.3	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.2
Cl (mEq/L)	105 ± 1	106 ± 1	105 ± 1	104 ± 1	107 ± 2	105 ± 2
Ca (mg/dL)	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.4 ± 0.2	9.8 ± 0.1	9.9 ± 0.2
IP (mg/dL)	6.3 ± 0.4	6.4 ± 0.5	6.3 ± 0.6	5.9 ± 0.6	5.6 ± 0.3	5.8 ± 0.5
Female (dam)						
No. of animals examined	12	11	12	8	5	5
Total protein (g/dL)	6.1 ± 0.4	6.1 ± 0.3	6.2 ± 0.3	6.2 ± 0.3	6.7 ± 0.4	6.4 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.9 ± 0.3	3.7 ± 0.1
A/G ratio	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1 **	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2
Total bilirubin (mg/dL)	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01
Glucose (mg/dL)	144 ± 9	149 ± 12	159 ± 20	147 ± 11	161 ± 19	153 ± 11
Total cholesterol (mg/dL)	56 ± 14	60 ± 7	62 ± 10	70 ± 13	71 ± 12	62 ± 13
Triglyceride (mg/dL)	55 ± 22	78 ± 39	91 ± 58	41 ± 16	25 ± 8	23 ± 10
Phospholipid (mg/dL)	117 ± 25	126 ± 13	133 ± 17	135 ± 19	137 ± 14	125 ± 25
AST (IU/L)	73 ± 10	75 ± 6	73 ± 12	91 ± 19	54 ± 2	63 ± 10
ALT (IU/L)	41 ± 8	42 ± 9	42 ± 7	52 ± 16	19 ± 1	20 ± 5
LDH (IU/L)	156 ± 80	133 ± 46	129 ± 57	122 ± 58	95 ± 43	105 ± 80
ALP (IU/L)	169 ± 88	151 ± 50	193 ± 69	201 ± 45	97 ± 13	103 ± 14
γ-GTP (IU/L)	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
CK (IU/L)	88 ± 17	85 ± 10	89 ± 19	87 ± 14	72 ± 17	75 ± 15
BUN (mg/dL)	17.6 ± 4.4	18.8 ± 3.9	21.2 ± 2.8	20.4 ± 3.4	15.0 ± 2.9	16.2 ± 1.6
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1
Na (mEq/L)	143 ± 2	143 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	141 ± 1	141 ± 1
K (mEq/L)	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.1	3.9 ± 0.5	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.2
Cl (mEq/L)	106 ± 2	106 ± 2	104 ± 2	104 ± 2	105 ± 2	105 ± 2
Ca (mg/dL)	10.5 ± 0.4	10.6 ± 0.3	10.9 ± 0.4	10.7 ± 0.5	10.1 ± 0.1	9.7 ± 0.1 **
IP (mg/dL)	7.8 ± 0.9	7.3 ± 0.7	7.9 ± 0.9	7.3 ± 0.7	4.0 ± 0.6	3.9 ± 1.0
Satellite female						

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$.

Table 6 Organ weights of male rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		At the end of administration period				At the end of recovery period	
		0	3	10	30	0	30
No. of animals examined		7	12	12	7	5	5
Body weight	(g)	486 ± 59	468 ± 50	471 ± 49	462 ± 21	467 ± 53	467 ± 70
Thymus	(g)	0.415 ± 0.064	0.379 ± 0.066	0.401 ± 0.109	0.415 ± 0.105	0.373 ± 0.044	0.462 ± 0.138
	(%)	0.085 ± 0.005	0.081 ± 0.011	0.085 ± 0.020	0.090 ± 0.021	0.081 ± 0.014	0.098 ± 0.018
Adrenals	(g)	0.071 ± 0.008	0.067 ± 0.007	0.069 ± 0.007	0.073 ± 0.007	0.075 ± 0.007	0.070 ± 0.007
	(%)	0.015 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.016 ± 0.002	0.015 ± 0.003
Heart	(g)	1.468 ± 0.232	1.404 ± 0.166	1.402 ± 0.158	1.331 ± 0.189	1.456 ± 0.133	1.412 ± 0.159
	(%)	0.302 ± 0.026	0.300 ± 0.022	0.298 ± 0.019	0.289 ± 0.047	0.313 ± 0.015	0.304 ± 0.029
Kidneys	(g)	2.969 ± 0.360	2.781 ± 0.225	2.960 ± 0.298	3.070 ± 0.313	2.942 ± 0.248	2.873 ± 0.263
	(%)	0.613 ± 0.046	0.597 ± 0.047	0.631 ± 0.053	0.665 ± 0.064	0.632 ± 0.025	0.620 ± 0.047
Spleen	(g)	0.750 ± 0.139	0.675 ± 0.100	0.686 ± 0.095	0.908 ± 0.138 *	0.719 ± 0.056	0.754 ± 0.116
	(%)	0.155 ± 0.031	0.145 ± 0.024	0.146 ± 0.017	0.197 ± 0.030 **	0.155 ± 0.009	0.163 ± 0.024
Liver	(g)	12.91 ± 1.978	12.392 ± 2.557	12.919 ± 1.991	13.061 ± 1.031	11.357 ± 0.991	11.952 ± 2.008
	(%)	2.653 ± 0.170	2.625 ± 0.280	2.733 ± 0.204	2.827 ± 0.174	2.442 ± 0.153	2.559 ± 0.176
Brain	(g)	2.113 ± 0.113	2.120 ± 0.086	2.097 ± 0.072	2.137 ± 0.089	2.045 ± 0.079	2.104 ± 0.046
	(%)	0.438 ± 0.036	0.457 ± 0.047	0.449 ± 0.041	0.463 ± 0.028	0.441 ± 0.043	0.459 ± 0.073
Testes	(g)	3.482 ± 0.283	3.341 ± 0.306	3.177 ± 0.348	3.310 ± 0.255	3.374 ± 0.243	3.215 ± 0.225
	(%)	0.722 ± 0.071	0.721 ± 0.105	0.682 ± 0.099	0.717 ± 0.056	0.728 ± 0.070	0.700 ± 0.112
Epididymides	(g)	1.275 ± 0.128	1.240 ± 0.098	1.227 ± 0.066	1.230 ± 0.079	1.255 ± 0.077	1.228 ± 0.058
	(%)	0.264 ± 0.024	0.268 ± 0.039	0.263 ± 0.030	0.267 ± 0.022	0.271 ± 0.025	0.268 ± 0.045
Thyroid	(g)	0.040 ± 0.010	0.037 ± 0.008	0.037 ± 0.006	0.097 ± 0.039 **	0.036 ± 0.006	0.051 ± 0.012 *
	(%)	0.008 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.021 ± 0.009 **	0.008 ± 0.001	0.011 ± 0.002 **
Pituitary	(g)	0.020 ± 0.004	0.020 ± 0.003	0.019 ± 0.003	0.020 ± 0.003	0.020 ± 0.003	0.020 ± 0.005
	(%)	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$.

Table 7 Organ weights of female rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		At the end of administration period				At the end of recovery period	
		0	3	10	30	0	30
Female (dam)						Satellite female	
No. of animals examined		12	11	12	8	5	5
Body weight	(g)	284 ± 28	285 ± 22	286 ± 22	267 ± 16	284 ± 20	268 ± 16
Thymus	(g)	0.242 ± 0.072	0.237 ± 0.063	0.234 ± 0.065	0.158 ± 0.041 *	0.401 ± 0.059	0.350 ± 0.019
	(%)	0.084 ± 0.023	0.083 ± 0.020	0.082 ± 0.019	0.058 ± 0.014 *	0.143 ± 0.029	0.131 ± 0.012
Adrenals	(g)	0.079 ± 0.009	0.078 ± 0.010	0.081 ± 0.009	0.079 ± 0.011	0.073 ± 0.011	0.074 ± 0.006
	(%)	0.028 ± 0.004	0.027 ± 0.004	0.028 ± 0.003	0.030 ± 0.006	0.026 ± 0.004	0.027 ± 0.002
Heart	(g)	0.945 ± 0.090	0.947 ± 0.095	0.974 ± 0.079	0.880 ± 0.035	0.950 ± 0.105	0.916 ± 0.050
	(%)	0.333 ± 0.017	0.332 ± 0.024	0.341 ± 0.017	0.331 ± 0.020	0.334 ± 0.019	0.343 ± 0.026
Kidneys	(g)	1.811 ± 0.141	0.719 ± 0.143	1.852 ± 0.166	1.791 ± 0.182	1.745 ± 0.195	1.724 ± 0.174
	(%)	0.641 ± 0.043	0.603 ± 0.035	0.649 ± 0.047	0.671 ± 0.052	0.615 ± 0.054	0.643 ± 0.057
Spleen	(g)	0.704 ± 0.194	0.605 ± 0.107	0.598 ± 0.122	0.766 ± 0.104	0.463 ± 0.066	0.548 ± 0.055
	(%)	0.247 ± 0.057	0.213 ± 0.040	0.209 ± 0.032	0.288 ± 0.045	0.164 ± 0.025	0.204 ± 0.013 *
Liver	(g)	9.297 ± 1.161	9.427 ± 1.084	9.947 ± 0.646	9.553 ± 0.956	7.207 ± 0.690	6.877 ± 0.627
	(%)	3.275 ± 0.268	3.298 ± 0.253	3.488 ± 0.133	3.578 ± 0.276 *	2.543 ± 0.204	2.567 ± 0.195
Brain	(g)	1.921 ± 0.083	1.891 ± 0.075	1.909 ± 0.088	1.870 ± 0.086	1.989 ± 0.061	1.931 ± 0.122
	(%)	0.682 ± 0.066	0.666 ± 0.052	0.671 ± 0.050	0.702 ± 0.037	0.704 ± 0.044	0.721 ± 0.034
Thyroid	(g)	0.030 ± 0.003	0.026 ± 0.005	0.031 ± 0.007	0.040 ± 0.011	0.032 ± 0.005	0.035 ± 0.012
	(%)	0.011 ± 0.002	0.009 ± 0.001	0.011 ± 0.003	0.015 ± 0.004 *	0.011 ± 0.001	0.013 ± 0.005
Pituitary	(g)	0.025 ± 0.004	0.025 ± 0.004	0.025 ± 0.004	0.023 ± 0.005	0.023 ± 0.003	0.022 ± 0.003
	(%)	0.009 ± 0.002	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$.

Table 8 Histopathological findings of rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		Male						Female					
		At the end of administration period				At the end of recovery period		At the end of administration period				At the end of recovery period	
		0	3	10	30	0	30	0	3	10	30	0	30
No. of animals examined		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
(Liver)	(Grade)												
fatty change: central	+	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	2+	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hepatocellular hypertrophy: central	+	0	0	0	0	0	2	0	0	0	5	0	1
	2+	0	0	0	5	0	2	0	0	0	0	0	0
necrosis: focal	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
granulation	+	1	2	1	1	1	2	1	0	0	1	0	0
	2+	0	0	0	3	0	2	0	0	0	4	0	5
(Heart)													
inflammatory cell nest	+	1	2	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0
(Lung)													
accumulation of foamy cells	+	2	2	1	3	3	4	3	2	4	2	2	3
fibrosis: focal	+	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
(Kidney)													
eosinophilic body	+	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
regeneration: proximal tubule	+	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Spleen)													
deposit of hemosiderin	+	0	0	1	4	0	2	0	0	0	5	5	5
	2+	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0
extramedullary hematopoiesis	+	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
(Thyroid)													
ultimobranchial body remanet	+	0	0	2	1	0	1	0	2	0	0	0	3
follicular hyperplasia	+	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
(Pituitary)													
Rathke pouch	+	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
No. of animals examined		<7>	<12>	<12>	<7>	<5>	<5>	<—>	<—>	<—>	<—>	<—>	<—>
(Testis)													
tubular atrophy	+	0	0	1	0	0	0	—	—	—	—	—	—
	2+	0	1	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
(Epididymis)													
debris of spermatic elements	+	0	1	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
spermatogenic granuloma	2+	0	0	2	0	0	0	—	—	—	—	—	—
(Prostate)													
inflammation	+	2	4	6	0	3	1	—	—	—	—	—	—
	2+	1	2	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—

Grade; +: slight, 2+: moderate, 3+: marked.

Data represent the number of animals.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$.

Table 9 Estrous cycle and reproductive performance of rats treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	3	10	30
Estrous cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Normal ^{1), 3)}	11	12	12	12
Abnormal ¹⁾	1	0	0	0
Cycles (days) ²⁾	4.3 ± 0.5	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.4	4.1 ± 0.2
Reproductive performance				
No. of mated pairs	12	12	12	12
No. of copulated pairs	12	12	12	12
Copulation index (%)	100	100	100	100
No. of pregnant females	12	11	12	12
Fertility index (%)	100	91.7	100	100
Pairing days until copulation ²⁾	3.5 ± 3.4	2.6 ± 1.1	2.8 ± 1.4	2.7 ± 1.3
Parturition and nursing ¹⁾				
No abnormalities detected	12	11	12	8
Maternal death immediately before parturition	0	0	0	4

¹⁾ Data represent the number of animals.

²⁾ Data represent mean ± S.D.

³⁾ 4 to 6 days cycle

Copulation index = (No. of copulated pairs / No. of mated pairs) × 100.

Fertility index = (No. of pregnant females / No. of copulated pairs) × 100.

Table 10 Summary of development of pups from dams treated orally with 4,4'-diaminodiphenyl ether in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		3		10		30	
No. of pregnant females	12		11		12		12	
No. of pregnant females with live pups	12		11		12		8	
Gestation index (%)	100		100		100		66.7	
Gestation length (days)	21.8 ± 0.4	(12)	22.0 ± 0.0	(11)	22.1 ± 0.3	(12)	22.1 ± 0.4	(8)
No. of corpora lutea	15.3 ± 2.0	(12)	15.2 ± 1.4	(11)	15.3 ± 1.6	(12)	14.2 ± 2.9	(12)
No. of implantations	14.3 ± 2.8	(12)	13.6 ± 2.3	(11)	13.8 ± 3.3	(12)	13.3 ± 2.0	(12)
Implantation index (%)	93.5 ± 12.4	(12)	89.8 ± 12.9	(11)	89.6 ± 19.5	(12)	94.7 ± 8.7	(12)
No. of pups born	13.3 ± 2.6	(12)	12.9 ± 2.3	(11)	13.2 ± 3.2	(12)	8.2 ± 6.6	(12)
Delivery index (%)	93.4 ± 6.4	(12)	94.8 ± 7.0	(11)	96.1 ± 4.6	(12)	59.8 ± 45.4	(12)
Day 0 of lactation								
No. of live pups	13.2 ± 2.6	(12)	12.8 ± 2.4	(11)	12.8 ± 3.1	(12)	11.6 ± 3.6	(8)
Birth index (%)	92.3 ± 6.3	(12)	94.0 ± 6.8	(11)	93.9 ± 7.3	(12)	84.8 ± 15.4	(8)
Live birth index (%)	98.8 ± 2.8	(12)	99.2 ± 2.5	(11)	97.6 ± 4.5	(12)	94.0 ± 5.5 *	(8)
Pups weight (g)								
Male	6.4 ± 0.5	(11)	6.8 ± 0.4	(11)	6.6 ± 0.4	(12)	5.9 ± 0.4 *	(8)
Female	6.2 ± 0.7	(12)	6.4 ± 0.3	(11)	6.3 ± 0.4	(12)	5.6 ± 0.5 *	(8)
Day 4 of lactation								
No. of live pups	13.1 ± 2.5	(12)	12.6 ± 2.2	(11)	12.8 ± 3.1	(12)	7.5 ± 2.2 **	(8)
Viability index (%)	99.4 ± 2.0	(12)	98.7 ± 2.8	(11)	99.4 ± 2.2	(12)	66.5 ± 14.2 **	(8)
Pups weight (g)								
Male	10.0 ± 1.6	(11)	10.6 ± 1.3	(11)	10.5 ± 1.0	(12)	10.3 ± 1.1	(8)
Female	9.9 ± 1.7	(12)	10.1 ± 1.2	(11)	10.1 ± 0.9	(12)	9.8 ± 2.0	(8)
Sex ratio on day 0								
Total no. of pups born ¹⁾	160	(12)	142	(11)	158	(12)	98	(8)
Total no. of male pups born ¹⁾	71	(12)	68	(11)	85	(12)	49	(8)
Sex ratio of pups ¹⁾	0.42 ± 0.15	(12)	0.48 ± 0.09	(11)	0.54 ± 0.12	(12)	0.52 ± 0.20	(8)
Total no. of live pups	158	(12)	141	(11)	154	(12)	93	(8)
Total no. of live male pups	71	(12)	68	(11)	81	(12)	46	(8)
Sex ratio of live pups	0.43 ± 0.16	(12)	0.49 ± 0.10	(11)	0.53 ± 0.13	(12)	0.51 ± 0.19	(8)
Sex ratio on day 4								
Total no. of live pups	157	(12)	139	(11)	153	(12)	60	(8)
Total no. of live male pups	70	(12)	67	(11)	81	(12)	30	(8)
Sex ratio of live pups	0.43 ± 0.16	(12)	0.49 ± 0.09	(11)	0.53 ± 0.13	(12)	0.53 ± 0.23	(8)

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$.

Parentheses represent the number of litters examined.

Gestation index = (No. of pregnant females with live pups / No. of pregnant females) × 100.

Implantation index = (No. of implantations / No. of corpora lutea) × 100.

Delivery index = (No. of pups born / No. of implantations) × 100.

Birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of implantations) × 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 = No. of male pups / No. of male and female pups.

¹⁾ Excepting pups of undetermined sex.