

いることから、被験物質投与による影響であると考えられる。

尿の沈渣結晶として、リン酸様結晶の増加も認められた。リン酸結晶は、ラットの尿沈渣に一般的に観察される結晶で、本試験においても対照群を含むほぼ全例に観察された。対照群では沈渣結晶の増加は雌雄ともに認められなかったが、被験物質各投与群では沈渣結晶の増加する例があり、そのうち、8 mg/kg投与群の雌雄および40 mg/kg投与群の雄の例では、リン酸様結晶だけが観察された。前述のように、被験物質投与によってシュウ酸カルシウム様結晶が出現してくるが、その前段階として、生理的に存在する沈渣結晶が増加してくる可能性も考えられる。しかし、シュウ酸カルシウム様の沈渣結晶が1例に観察された40 mg/kg投与群の雌では、この例以外に沈渣結晶の増加する例は認められなかった。また、尿沈渣にシュウ酸カルシウムを増加させるエチレングリコールを、Fisher 344ラットに2年間混餌投与した試験⁷⁾でも、三リン酸塩の増加とエチレングリコールの投与量あるいは投与期間との関連性は認められていない。さらに、本試験と同様の条件下で、同系統のラットを飼育すると、本試験でみられたのと近傍の週齢(18週齢)に沈渣結晶が増加してくるものが認められている⁸⁾。従って、リン酸様結晶を主体とする沈渣結晶は、自然発生により増加したものと判断された。

雌において、尿比重の有意な低下が40 mg/kg以上の投与群に認められた。サテライト群の雌でも、対照群との間に有意差は認められなかったが、200 mg/kg投与により尿比重が低下する傾向が認められ、被験物質投与による影響であると考えられる。尿比重の低下は、尿量の増加を伴うことが多いが、本試験では、新鮮尿を検査したため、尿量に及ぼす影響は明らかではない。しかし、一般状態の観察で認められるような尿量の増加は認められず、比重の低下も僅かであった。さらに、投与終了時の剖検では、腎臓重量あるいは腎臓の病理組織学所見に被験物質投与の影響は認められず、血液生化学検査成績にも腎機能の異常を示唆する変化は認められなかったことから軽度な影響であると考えられる。雌における尿検査と近接した投与時期に尿検査を実施した雄に尿比重の変化は認められなかった。予備試験では1000 mg/kg投与により雄の腎臓に明瞭な毒性変化が認められたが、本試験では、腎臓重量あるいは腎臓の病理組織学所見に被験物質投与の影響は認められなかった。さらに、血液生化学検査の成績にも腎臓機能の変化を示唆する変化は認められず、混濁やシュウ酸カルシウム様沈渣結晶の出現といった尿の性状変化が40 mg/kg以上の投与群で認められたのみであった。

雄の投与終了時における血液学検査では、40 mg/kg投与群において平均赤血球容積および平均赤血球色素量がやや低下したが、軽度であり、用量に依存した変化ではなかったことから、これらは偶発的な変化であると考えられる。また、同時期に実施した血液生化学検査において、200 mg/kg投与群におけるナトリウム濃度が僅かに低下した。しかし、ナトリウム濃度以外に変化の認め

られた項目はなく、また、個体毎に比較しても、カリウム濃度を含めて関連して変動した検査項目は認められなかった。さらに、尿比重の低下が認められている雌でも血漿ナトリウム濃度を含めて血液生化学の各検査項目に投与の影響は認められなかったことから、200 mg/kg投与群の雄における血漿ナトリウム濃度の僅かな低下は偶発的な変化である可能性が高い。

雌の投与終了時における血液学検査および血液生化学検査では、いずれの項目についても被験物質投与の影響は認められなかった。サテライト群は、回復15日にこれらの検査を行ったが、200 mg/kg投与群において、AST(GOT)活性が対照群と比較して有意な低値を示した。しかし、逸脱酵素の活性が低下したことは、被験物質の影響を示唆するものではなく、むしろ対照群における活性がやや高かったことによるものと考えられる。従って4,4'-ビフェニルジオールは、回復15日における血液生化学検査の成績にも影響は及ぼさないと考えられる。

雌雄ともに、上記以外に、尿検査、血液学検査ならびに血液生化学検査において、被験物質投与との関連性を考慮すべき項目はなかった。

投与終了時に測定した雄の器官重量は、200 mg/kg投与群において肝臓相対重量が増加し、副腎重量が低下した。いずれも軽度な変化であったが、肝臓の剖検所見として、腫大あるいは暗色調の認められる例もあり、さらに病理組織学検査では、対照群の肝臓には認められなかった小葉中心性肝細胞肥大を認める例もあった。回復期間終了時の剖検ではこうした変化が認められなかったことから、4,4'-ビフェニルジオールの反復投与が雄の肝臓に形態学的変化をもたらすことにより、肝臓相対重量を増加させたものと考えられる。雌の肝臓にはこれらの変化は認められていないことから、4,4'-ビフェニルジオールが肝臓に及ぼす影響には性差の存在する可能性が示唆された。これらの他に、200 mg/kg投与群の雄の肝臓には門脈周囲性の脂肪化の程度の減弱も認められた。一方、副腎の病理組織学検査では、異常所見はいずれの動物にも認められず、副腎皮質ホルモンの影響を受けやすい胸腺重量にも、被験物質投与の影響は認められなかった。さらに、1000 mg/kgを反復投与した4,4'-ビフェニルジオールの予備試験では、副腎重量はむしろ増加していたことから、200 mg/kg投与群の雄における副腎重量の低下は偶発的な変化である可能性が高い。

雌の器官重量には被験物質投与の影響は認められなかった。

4,4'-ビフェニルジオールの予備試験において腎臓に変化が認められたことから、本試験では、雌雄ともに全ての投与群において病理組織学検査を行った。しかし、いずれの所見も対照群と被験物質投与群との間で差は認められず、また、用量に依存した変化の認められた所見あるいは、投与終了時と回復15日との間で明瞭な変化の認められた所見もなかった。これらのことから、200 mg/kgまでの4,4'-ビフェニルジオールは腎臓の形態に明瞭な影響は及ぼさないと考えられた。

200 mg/kg 投与群において哺育1日までに全出生児が死亡した1例に、脾臓および胸腺の小型化が観察され、病理組織学検査でもこれらの組織に所見が認められたが、投与終了時の剖検例に類似した所見は認められなかった。また、上記の雄における肝臓の所見以外はいずれも対照群と被験物質投与群との間で差は認められず、被験物質投与の影響によるものではないと考えられる。

以上のように、4,4'-ビフェニルジオールの反復投与の結果、40 mg/kg 以上の4,4'-ビフェニルジオールは雌雄の尿を混濁させ、雌では40 mg/kg 以上の投与量により尿沈渣にシュウ酸カルシウム様結晶を出現させ、尿比重を低下させることが認められた。また、雄では、200 mg/kg により尿沈渣にシュウ酸カルシウム様結晶を出現させ、これら尿の変化により、一般状態の観察において、200 mg/kg 投与により雌雄動物の尿が排泄後の時間経過に伴い白濁するのが認められた。さらに、200 mg/kg の4,4'-ビフェニルジオールは雄に対してのみ組織学的変化を伴う肝臓重量の増加を招来するが、いずれも投与の中止によって回復することが明らかになった。

2. 生殖発生毒性

200 mg/kg 投与を受けても性周期の変化した動物はなく、全例が交尾して受胎したことから、200 mg/kg までの被験物質投与は性周期および交配のいずれにも影響を及ぼさないと考えられる。

妊娠期間はいずれも正常で、被験物質投与は妊娠期間に影響を及ぼさないと考えられるが、200 mg/kg 投与群において12例中1例の母動物に全出生児の死亡が認められた。この例では、生死にかかわらず産児はケージ内に散乱し、生存児には腹部にミルクスポットが認められず、また、体重も他の腹の生存児と比べて低かったが、形態異常は観察されなかったことから、分娩における母性行動の欠如があったものと判断された。市販の繁殖用飼料の給与を受けているSD系妊娠ラットに、比較的大量のコーン油を毎日経口投与すると、腎臓の尿細管上皮が障害され、分娩の翌日までに母動物の全身状態が悪化して出生児の生存率が低下することが報告されている⁹⁾。200 mg/kg の4,4'-ビフェニルジオールは、尿沈渣にシュウ酸カルシウム様結晶を増加させ、尿比重を軽度低下させる量であることから、腎臓に対する本被験物質の負荷と分娩の異常との関連性が示唆されるが、本例の分娩前後における全身状態に異常は観察されなかった。また、本例以外に、全出生児の死亡を認める例もなく、分娩時における生存率が著しく低下した例もなかったことから、4,4'-ビフェニルジオールの腎臓に対する負荷と全出生児死亡との関連性は乏しいと考えられる。母動物の全身状態他に、母性行動には、神経内分泌学的な要因も大きく影響する。4,4'-ビフェニルジオールは、エストロゲン受容体と結合親和性を有し^{10,11)}、去勢雌ラットの子宮重量を増加させる活性も有している¹¹⁾。分娩直前のラットでは、後分娩排卵に向けて卵巣にグラフ卵胞が形成され、エストロゲンが盛んに分泌されているが、本試験において投与した4,4'-ビフェニルジオールが、

内因性のエストロゲンを凌駕するだけのエストロゲン活性を有していると仮定すると、4,4'-ビフェニルジオールが母性行動に関わる神経内分泌に影響を及ぼした可能性も考えられる。しかし、エストロゲンは、ラットに対して、直接的にも、また、母性行動を促進するプロラクチンの下垂体前葉からの分泌を亢進させることによって間接的にも、母性行動を促進すると考えられている¹²⁾。従って、4,4'-ビフェニルジオールが有すると報告されているエストロゲン活性が、分娩時の母性行動に関わる神経内分泌に悪影響を及ぼして、分娩時の母性行動を欠如させた可能性は乏しいと考えられる。本試験では、母性行動の欠如によると考えられる全出生児の死亡が高用量群の1例に観察されたが、本試験と同一の試験ガイドライン下で実施した試験¹³⁾の媒体(注射用水)投与群にも母性行動の欠如による全出生児の死亡が1例に認められている。この例も本例と同様に、分娩前後における母動物の全身状態にも、出生児にも異常は認められていないことから、本例における分娩時の母性行動の欠如も被験物質投与とは関連しない変化であると判断された。哺育状態についても、異常の認められた例はなく、また、本例以外に全出生児が死亡した例もなかったことから、200 mg/kg までの4,4'-ビフェニルジオールは分娩および哺育状態に影響を及ぼさないと考えられる。

黄体数、着床数、着床率、産児数、分娩率、生存児数、生児出産率、出生率、新生児の4日の生存率のいずれについても、対照群と被験物質各投与群との間で差は認められず、着床前から出生後の哺育4日に到るまでの生存に、200 mg/kg までの4,4'-ビフェニルジオールは影響を及ぼさないと考えられる。また、性比にも影響は認められなかった。

出生児の成長についても、哺育0および4日の体重に、対照群と被験物質各投与群との間に差は認められず、被験物質投与の影響は認められなかった。さらに、生存死亡のいずれにおいても形態異常を示す出生児は認められなかったことから、200 mg/kg までの4,4'-ビフェニルジオールは出生児の形態に影響を及ぼさないと考えられる。

3. 無作用量

以上の試験成績から、本試験条件下では、4,4'-ビフェニルジオールの無作用量は、反復投与毒性に関しては、雌雄いずれにおいても40 mg/kg/day 以上の投与群で尿の混濁が認められたことから、雌雄ともに8 mg/kg/day であると結論される。生殖発生毒性に関しては、200 mg/kg/day を投与しても雌雄ともに影響が認められなかったことから200 mg/kg/day であると結論される。出生児に関しても投与の影響が認められなかったことから200 mg/kg/day であると結論される。また、雌雄動物に認められた4,4'-ビフェニルジオール投与に起因すると考えられる変化は、投与の中止後2週間までに回復し、その間、遅発性の変化は認められないと結論される。

文献

- 1) National Technical Information Service: OTS0534530, Springfield, VA, USA.
- 2) Ciranni R, Barale R, Marrazzini A, Loprieno N: Benzene and genotoxicity of its metabolites, 1. Transplacental activity in mouse fetuses and in their dams. *Mutation Res*, 208:61-67(1988).
- 3) 金井泉:「臨床検査法提要(改訂29版)」金井正光(編), 金原出版, 東京(1983).
- 4) 藤森勲, 小沢亨史, 佐藤和文, 小林寛, 神谷一成, 片瀬史朗:「尿沈渣カラーアトラス」岡本一也(監), 近代出版, 東京(1992).
- 5) 長浜大輔:「尿沈渣第4版」文光堂, 東京(1993).
- 6) Bruckner J, Warren DA: Toxic effects of solvents and vapors. In "Casarett and Doull's Toxicology", 6th ed., Klaassen CD(ed.), McGraw-Hill, New York(2001)pp.869-916.
- 7) DePass LR, Garman RH, Woodside MD, Giddens WE, Maronpot RR, Weil CS:Chronic toxicity and oncogenicity studies of ethylene glycol in rats and mice. *Fund Appl Toxicol*, 7:547-565(1986).
- 8) Tanaka A, Azegami Z, Kojima K, Imai K: Response to commercial low protein diet. in "Biological Reference Data on Crj:CD(SD)IGS Rats -1998", Matsuzawa T, Inoue H(eds.), CD(SD)IGS Study Group, Yokohama(1998)pp.19-30.
- 9) Sato M, Wada K, Marumo H, Nagao T, Imai K, Ono H: Influence of corn oil and diet on reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*, 56:156-164(2000).
- 10) Paris F, Balaguer P, Terouanne B, Servant N, Lacoste C, Cravedi JP, Nicolas JC, Sultan C: Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-*tert*-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell line. *Mol Cell Endocrinol*, 193:43-49(2002).
- 11) Yamasaki K, Imatanaka N, Yakabe Y: Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicol Lett*, 146:111-120(2004).
- 12) Numan M:Maternal behavior, in "Physiology of Reproduction", 2nd ed., vol. 1, Knobil E, Neil JD(eds.), Raven Press, New York(1994)pp.221-302.
- 13) 代田真理子ら:臭化リチウム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. 化学物質毒性試験報告, 10:329-346(2003).

連絡先

試験責任者: 代田真理子
 試験担当者: 田子和美
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Mariko Shirota (Study director)
 Kazumi Tago
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257-8523,
 Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Urinalysis of rats treated orally with 4,4'-biphenyldiol in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity

Dose (mg/kg)	On day 31 of administration				On day 11 of recovery		
	0	8	40	200	0	200	
Male							
Number of animals	10	5	5	10	5	5	
Specific gravity ^{a)}	1.030 ± 0.010	1.038 ± 0.008	1.031 ± 0.011	1.031 ± 0.004	1.033 ± 0.004	1.029 ± 0.009	
Quality							
Color	light yellow	10	5	5	10	5	5
Turbidity	negative	10	5	4	0	5	5
	slight	0	0	0	3	0	0
	moderate	0	0	1	4	0	0
	marked	0	0	0	3	0	0
pH	7.0	2	2	0	7	1	1
	7.5	5	2	1	2	4	1
	8.0	2	0	4	1	0	3
	8.5	1	1	0	0	0	0
Protein	negative	2	0	2	7	0	0
	trace	4	2	0	2	0	1
	30 ≤ and <100 mg/dL	3	3	3	1	4	4
	100 ≤ and <300 mg/dL	1	0	0	0	1	0
Glucose	negative	10	5	5	10	5	5
Ketone	negative	7	1	3	7	1	3
	trace	2	4	1	3	3	2
	slight	1	0	1	0	1	0
Bilirubin	negative	10	5	5	10	5	5
Occult blood	negative	10	5	5	10	5	5
Urobilinogen	0.1 ≤ and <1.0 EU/dL	10	5	5	10	4	4
	1.0 ≤ and <2.0 EU/dL	0	0	0	0	1	1
Microscopic examination of urinary sediment							
Crystal							
Grade	a few	10	4	3	0	5	5
	abundant	0	1	2	10	0	0
Shape	phosphate-like	10	5	5	8	5	5
	calcium oxalate-like	0	0	0	8	0	0
Epithelial cells	a few	0	0	0	0	3	3

a) values represent mean ± S.D.

Table 1 (Continued)

Dose (mg/kg)	On day 32 of administration						On day 11 of recovery		
	0	8	40	200	0 ^{a)}	200 ^{a)}	0 ^{a)}	200 ^{a)}	
Female									
Number of animals	7	7	7	7	5	5	5	5	
Specific gravity ^{b)}	1.038 ± 0.008	1.039 ± 0.006	1.028 ± 0.008*	1.026 ± 0.005**	1.034 ± 0.014	1.028 ± 0.004	1.029 ± 0.013	1.033 ± 0.012	
Quality									
Color	light yellow	7	7	7	7	5	5	5	5
Turbidity	negative	7	7	5	1	5	1	5	5
	slight	0	0	2	5	0	2	0	0
	moderate	0	0	0	1	0	2	0	0
pH	6.0	0	1	0	0	0	0	0	0
	6.5	1	1	0	0	0	0	0	0
	7.0	2	1	2	4	2	2	0	3
	7.5	2	2	5	3	1	2	1	2
	8.0	1	1	0	0	2	1	3	0
	8.5	1	1	0	0	0	0	1	0
Protein	negative	3	4	7	7	3	5	3	2
	trace	3	1	0	0	0	0	0	3
	30 ≤ and <100 mg/dL	1	2	0	0	2	0	2	0
	100 ≤ and <300 mg/dL	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucose	negative	7	7	7	7	5	5	5	5
Ketone	negative	5	5	7	7	5	5	5	5
	trace	2	2	0	0	0	0	0	0
Bilirubin	negative	7	7	7	7	5	5	5	5
Occult blood	negative	7	7	7	7	5	5	5	5
Urobilinogen	0.1 ≤ and <1.0 EU/dL	5	5	7	7	3	5	3	2
	1.0 ≤ and <2.0 EU/dL	2	2	0	0	2	0	2	3
Microscopic examination of urinary sediment									
Crystal									
Grade	a few	5	3	6	0	5	1	4	5
	abundant	0	2	1	7	0	4	0	0
Shape	phosphate-like	5	5	7	5	5	5	4	5
	calcium oxalate-like	0	0	1	6	0	4	0	0
Epithelial cells	a few	0	1	0	0	0	0	0	0

a) satellite group

b) values represent mean ± S.D.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 2 Hematological examination in rats treated orally with 4,4'-biphenyldiol in 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	8	40	200	0	200
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	841 \pm 19	852 \pm 32	873 \pm 20	843 \pm 27	859 \pm 31	889 \pm 32
Hemoglobin (g/dL)	15.2 \pm 0.5	15.4 \pm 0.5	14.9 \pm 0.4	14.9 \pm 0.6	15.1 \pm 0.1	15.6 \pm 0.5
Hematocrit (%)	46.0 \pm 1.6	46.4 \pm 1.8	45.0 \pm 1.1	45.1 \pm 1.7	45.6 \pm 0.7	46.8 \pm 1.7
MCV (fL)	54.6 \pm 2.0	54.5 \pm 1.4	51.5 \pm 1.3*	53.5 \pm 1.5	53.1 \pm 2.0	52.7 \pm 0.9
MCH (pg)	18.1 \pm 0.7	18.1 \pm 0.5	17.1 \pm 0.4*	17.7 \pm 0.7	17.5 \pm 0.6	17.6 \pm 0.3
MCHC (g/dL)	33.0 \pm 0.3	33.2 \pm 0.3	33.1 \pm 0.3	33.0 \pm 0.5	33.0 \pm 0.3	33.4 \pm 0.2
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	103.1 \pm 6.8	105.5 \pm 16.9	115.2 \pm 7.4	111.1 \pm 9.3	113.2 \pm 13.2	110.0 \pm 9.4
PT (sec)	19.0 \pm 3.9	20.1 \pm 2.9	18.4 \pm 1.4	17.7 \pm 2.5	15.8 \pm 2.0	20.2 \pm 4.4
APTT (sec)	24.0 \pm 2.7	24.4 \pm 1.6	24.0 \pm 1.0	23.6 \pm 1.1	23.1 \pm 1.7	24.4 \pm 1.8
WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	91.3 \pm 43.3	78.5 \pm 31.0	92.5 \pm 41.8	87.3 \pm 27.7	116.8 \pm 21.6	80.9 \pm 14.8*
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophil	15 \pm 5	14 \pm 5	13 \pm 4	10 \pm 5	10 \pm 3	10 \pm 1
Eosinophil	2 \pm 0	2 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 0	2 \pm 0
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	4 \pm 1	5 \pm 1	6 \pm 3	3 \pm 1	4 \pm 0	5 \pm 1
Lymphocyte	79 \pm 7	78 \pm 5	80 \pm 7	85 \pm 6	85 \pm 3	83 \pm 2
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5 ^{a)}	5 ^{a)}
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	688 \pm 42	651 \pm 67	643 \pm 39	655 \pm 62	806 \pm 17	820 \pm 59
Hemoglobin (g/dL)	13.3 \pm 0.3	13.2 \pm 0.9	12.4 \pm 0.7	12.7 \pm 0.9	15.0 \pm 0.5	15.1 \pm 0.7
Hematocrit (%)	40.2 \pm 1.4	39.8 \pm 2.6	37.4 \pm 2.3	38.1 \pm 2.9	44.6 \pm 1.1	45.2 \pm 2.1
MCV (fL)	58.5 \pm 2.0	61.4 \pm 3.2	58.2 \pm 2.8	58.3 \pm 1.3	55.4 \pm 0.7	55.2 \pm 1.9
MCH (pg)	19.3 \pm 0.9	20.3 \pm 1.0	19.3 \pm 0.9	19.4 \pm 0.4	18.6 \pm 0.4	18.5 \pm 0.7
MCHC (g/dL)	33.1 \pm 0.5	33.1 \pm 0.5	33.2 \pm 0.4	33.3 \pm 0.1	33.5 \pm 0.3	33.5 \pm 0.3
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	107.7 \pm 9.4	108.1 \pm 11.8	114.2 \pm 11.1	110.4 \pm 14.5	108.2 \pm 13.8	106.7 \pm 11.3
PT (sec)	12.7 \pm 0.7	13.4 \pm 0.9	12.7 \pm 0.4	13.0 \pm 0.7	12.3 \pm 0.6	12.4 \pm 0.6
APTT (sec)	18.4 \pm 1.4	18.8 \pm 2.3	18.7 \pm 0.9	18.7 \pm 0.7	18.6 \pm 0.8	19.8 \pm 0.9
WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	80.1 \pm 14.5	80.6 \pm 18.9	99.1 \pm 30.7	93.7 \pm 22.8	52.6 \pm 23.5	59.2 \pm 22.2
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophil	32 \pm 21	24 \pm 11	27 \pm 9	22 \pm 9	10 \pm 4	12 \pm 10
Eosinophil	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 0	1 \pm 0	2 \pm 1	2 \pm 2
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	4 \pm 2	4 \pm 1	5 \pm 2	4 \pm 1	4 \pm 2	3 \pm 2
Lymphocyte	63 \pm 20	71 \pm 11	68 \pm 10	73 \pm 10	85 \pm 6	83 \pm 13

a) satellite group
 Values represent mean \pm S.D.
 * $p < 0.05$

Table 3 Blood chemical examination in rats treated orally with 4,4'-biphenyldiol in 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	8	40	200	0	200
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.9 ± 0.1	5.8 ± 0.2	5.8 ± 0.3	6.0 ± 0.1	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.3	3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.2
A/G	1.48 ± 0.16	1.50 ± 0.08	1.5 ± 0.1	1.49 ± 0.11	1.58 ± 0.14	1.62 ± 0.2
BUN (mg/dL)	16 ± 1	18 ± 2	18 ± 1	18 ± 1	14 ± 1	16 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2
Glucose (mg/dL)	169 ± 13	160 ± 10	172 ± 15	175 ± 17	195 ± 29	174 ± 14
Total cholesterol (mg/dL)	40 ± 13	39 ± 4	46 ± 4	31 ± 6	55 ± 10	49 ± 8
Triglyceride (mg/dL)	40 ± 25	33 ± 6	53 ± 31	53 ± 16	61 ± 32	49 ± 20
ALP (U/L)	222 ± 45	195 ± 38	190 ± 63	237 ± 48	148 ± 22	155 ± 18
ALT (GPT) (U/L)	32 ± 6	33 ± 4	32 ± 8	30 ± 6	44 ± 14	32 ± 5
AST (GOT) (U/L)	73 ± 9	66 ± 5	68 ± 15	61 ± 9	76 ± 23	63 ± 7
γ-GTP (U/L)	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 0
Total bilirubin (mg/dL)	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.03	0.04 ± 0.02
Inorg. phos. (mg/dL)	6.1 ± 0.3	6.6 ± 0.4	6.9 ± 0.5	6.6 ± 0.7	6.7 ± 0.7	6.8 ± 0.5
Ca (mg/dL)	9.0 ± 0.2	9.0 ± 0.2	8.9 ± 0.2	9.1 ± 0.3	9.6 ± 0.2	9.3 ± 0.2
Na (mEq/L)	144.7 ± 0.3	144.9 ± 0.7	144.7 ± 0.7	143.7 ± 0.7*	143.9 ± 0.5	144.0 ± 0.9
K (mEq/L)	4.17 ± 0.27	4.31 ± 0.29	4.19 ± 0.32	4.46 ± 0.32	4.36 ± 0.3	4.32 ± 0.21
Cl (mEq/L)	107.3 ± 1.6	108.2 ± 0.8	107.8 ± 1.3	106.8 ± 1.7	105.8 ± 1.0	105.0 ± 2.1
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5 ^{a)}	5 ^{a)}
Total protein (g/dL)	6.1 ± 0.3	5.9 ± 0.4	5.9 ± 0.4	5.9 ± 0.3	6.7 ± 0.2	6.4 ± 0.2
Albumin (g/dL)	4.0 ± 0.3	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.3	3.9 ± 0.3	4.6 ± 0.2	4.3 ± 0.3
A/G	1.98 ± 0.24	1.81 ± 0.16	1.92 ± 0.28	2.01 ± 0.26	2.24 ± 0.15	1.97 ± 0.27
BUN (mg/dL)	17 ± 2.0	19 ± 2	16 ± 2	15 ± 2	22 ± 3	20 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	120 ± 3	117 ± 9	119 ± 3	117 ± 8	150 ± 17	163 ± 11
Total cholesterol (mg/dL)	53 ± 11	47 ± 10	49 ± 11	40 ± 13	65 ± 15	72 ± 9
Triglyceride (mg/dL)	39 ± 13	36 ± 36	27 ± 3	38 ± 11	29 ± 9	26 ± 10
ALP (U/L)	73 ± 27	85 ± 47	111 ± 29	121 ± 20	70 ± 17	86 ± 19
ALT (GPT) (U/L)	48 ± 10	40 ± 12	38 ± 7	42 ± 5	39 ± 20	25 ± 7
AST (GOT) (U/L)	73 ± 13	71 ± 5	59 ± 9	71 ± 6	87 ± 19	58 ± 13*
γ-GTP (U/L)	3 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1	2 ± 1	2 ± 1
Total bilirubin (mg/dL)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01
Inorg. phos. (mg/dL)	5.3 ± 0.5	5.6 ± 0.2	5.4 ± 0.7	5.2 ± 0.5	4.5 ± 0.7	4.6 ± 0.5
Ca (mg/dL)	9.2 ± 0.3	9.2 ± 0.4	9.2 ± 0.3	9.1 ± 0.1	9.5 ± 0.3	9.3 ± 0.4
Na (mEq/L)	142.9 ± 1.0	142.0 ± 1.0	142.0 ± 0.6	142.2 ± 1.0	142.1 ± 0.8	141.9 ± 0.7
K (mEq/L)	3.90 ± 0.18	3.82 ± 0.20	3.67 ± 0.10	3.69 ± 0.25	4.36 ± 0.23	4.24 ± 0.21
Cl (mEq/L)	108.8 ± 1.0	108.3 ± 2.3	108.3 ± 1.2	108.6 ± 0.9	106.5 ± 2.4	106.3 ± 1.0

a) satellite group

Values represent mean ± S.D.

* $p < 0.05$

Table 4 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 4,4'-biphenyldiol in 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	8	40	200	0	200
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Terminal body weight (g)	536.2 ± 29.1	517.2 ± 8.5	541.0 ± 31.4	509.5 ± 44.4	540.5 ± 40.2	534.7 ± 51.4
Brain (g)	2.05 ± 0.08	1.99 ± 0.05	2.10 ± 0.07	2.01 ± 0.07	2.00 ± 0.07	2.05 ± 0.09
(g%)	0.38 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.40 ± 0.05	0.37 ± 0.03	0.39 ± 0.04
Thymus (mg)	315.1 ± 35.2	367.1 ± 107.2	322.7 ± 46.2	379.0 ± 52.0	309.3 ± 57.1	291.2 ± 59.5
(mg%)	59.0 ± 7.9	71.1 ± 21.1	59.5 ± 5.7	75.0 ± 13.1	57.6 ± 12.5	54.1 ± 7.2
Heart (g)	1.44 ± 0.08	1.41 ± 0.12	1.49 ± 0.15	1.35 ± 0.12	1.49 ± 0.20	1.52 ± 0.10
(g%)	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.02
Liver (g)	15.13 ± 1.72	14.92 ± 1.24	16.67 ± 1.84	16.49 ± 1.86	15.14 ± 2.79	15.62 ± 2.24
(g%)	2.82 ± 0.22	2.88 ± 0.23	3.08 ± 0.21	3.23 ± 0.24*	2.79 ± 0.32	2.91 ± 0.21
Kidneys (g)	3.40 ± 0.19	3.38 ± 0.38	3.61 ± 0.18	3.50 ± 0.24	3.58 ± 0.22	3.50 ± 0.28
(g%)	0.64 ± 0.05	0.66 ± 0.08	0.67 ± 0.05	0.69 ± 0.06	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.03
Spleen (g)	0.88 ± 0.04	0.88 ± 0.02	0.90 ± 0.13	0.89 ± 0.13	0.81 ± 0.13	0.81 ± 0.09
(g%)	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.02
Testes (g)	3.40 ± 0.15	3.29 ± 0.21	3.47 ± 0.46	3.41 ± 0.14	3.56 ± 0.13	3.40 ± 0.16
(g%)	0.64 ± 0.03	0.64 ± 0.04	0.65 ± 0.11	0.68 ± 0.09	0.66 ± 0.04	0.64 ± 0.06
Epididymides (g)	1.29 ± 0.06	1.21 ± 0.12	1.22 ± 0.12	1.23 ± 0.05	1.31 ± 0.07	1.31 ± 0.08
(g%)	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.03
Adrenal glands (mg)	67.6 ± 7.4	61.1 ± 9.1	57.1 ± 3.7	53.3 ± 5.8*	61.8 ± 13.5	62.0 ± 11.7
(mg%)	12.6 ± 1.1	11.8 ± 1.7	10.6 ± 1.0	10.5 ± 1.3	11.3 ± 1.8	11.6 ± 1.7
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5 ^{a)}	5 ^{a)}
Terminal body weight (g)	317.4 ± 15.9	303.5 ± 23.1	297.0 ± 2.8	298.5 ± 5.4	283.7 ± 27.8	276.6 ± 17.6
Brain (g)	1.91 ± 0.04	1.88 ± 0.07	1.89 ± 0.07	1.84 ± 0.06	1.81 ± 0.11	1.87 ± 0.10
(g%)	0.60 ± 0.03	0.62 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.61 ± 0.02	0.64 ± 0.08	0.68 ± 0.06
Thymus (mg)	256.4 ± 74.0	227.5 ± 26.1	192.2 ± 30.8	298.1 ± 80.9	291.0 ± 47.3	259.8 ± 41.8
(mg%)	80.7 ± 21.8	74.9 ± 5.7	64.7 ± 10.3	99.6 ± 25.8	102.2 ± 9.3	93.8 ± 13.0
Heart (g)	1.00 ± 0.12	0.98 ± 0.07	0.89 ± 0.04	0.91 ± 0.07	0.89 ± 0.04	0.92 ± 0.09
(g%)	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.02
Liver (g)	10.56 ± 0.64	9.64 ± 1.61	9.94 ± 0.30	10.36 ± 0.34	7.82 ± 0.75	7.90 ± 1.06
(g%)	3.33 ± 0.14	3.16 ± 0.34	3.35 ± 0.11	3.47 ± 0.11	2.77 ± 0.19	2.85 ± 0.22
Kidneys (g)	1.94 ± 0.12	1.88 ± 0.15	1.98 ± 0.07	1.86 ± 0.10	1.94 ± 0.19	2.02 ± 0.21
(g%)	0.61 ± 0.06	0.62 ± 0.05	0.66 ± 0.03	0.62 ± 0.04	0.69 ± 0.10	0.73 ± 0.06
Spleen (g)	0.75 ± 0.05	0.78 ± 0.19	0.67 ± 0.07	0.65 ± 0.09	0.51 ± 0.11	0.50 ± 0.09
(g%)	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.05	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.02
Adrenal glands (mg)	79.5 ± 10.9	76.3 ± 4.6	74.8 ± 11.6	67.6 ± 6.9	60.8 ± 11.0	65.5 ± 4.8
(mg%)	25.1 ± 3.6	25.3 ± 3.3	25.2 ± 4.0	22.7 ± 2.7	21.4 ± 2.4	23.7 ± 0.7

a) satellite group

Values represent mean ± S.D.

* $p < 0.05$

Table 5 Histopathological examination in rats treated orally with 4,4'-biphenyldiol in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	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	8	40	200	0	200	0	8	40	200	0 ^{a)}	200 ^{a)}
(Testis)		[7]	[12]	[12]	[7]	[5]	[5]						
Atrophy, focal, seminiferous tubule	±	1	1	1	1	0	1						
	Total	1	1	1	1	0	1						
(Epididymis)		[7]	[12]	[12]	[7]	[5]	[5]						
Spermatic granuloma, cauda, unilateral	++	0	0	1	0	0	0						
	Total	0	0	1	0	0	0						
(Prostate: ventral lobe)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]						
Cellular infiltration, lymphocyte & neutrophil, epithelium/interstitium	±	1			1								
	+	0			1								
	++	1			0								
	Total	2			2								
(Liver)		[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	±	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Fatty change, periportal	±	0	2	2	5	2	4	4	5	3	4	1	3
	+	4	2	3	0	2	1	0	0	0	0	0	0
	++	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Total	5	5	5	5	5	5	4	5	3	4	1	3
Microgranuloma	±	3	3	4	3	1	1	2	1	1	0	2	1
	Total	3	3	4	3	1	1	2	1	1	0	2	1
Hematopoiesis, extramedullary	±	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
(Kidney)		[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]
Eosinophilic body	±	1	0	2	2	1	3	0	0	0	0	0	0
	+	1	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	3	2	0	1	0	0	0	0	0	0
	Total	2	2	5	5	2	5	0	0	0	0	0	0
Basophilic tubule, cortex	±	4	5	4	3	4	4	3	2	3	3	1	0
	Total	4	5	4	3	4	4	3	2	3	3	1	0
Mineralization	±	1	0	2	0	0	0	1	1	1	1	0	1
	Total	1	0	2	0	0	0	1	1	1	1	0	1
Cyst, focal, cortico-medullary junction	±	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	±	2	0	1	1	2	1	0	0	1	0	0	0
	Total	2	0	1	1	2	1	0	0	1	0	0	0
Dilatation, lumen, diffuse, distal tubule	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

a) satellite group

Grade of histopathological finding; ±: very slight, +: slight, ++: moderate.

Total: total number of animals with positive grade.

** p < 0.01

Table 5 (Continued)

Sex	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	8	40	200	0	200	0	8	40	200	0 ^{a)}	200 ^{a)}
(Lung & Bronchus)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]
Accumulation, foam cell, focal, alveolus	±	3			3			1			3		
	Total	3			3			1			3		
Mineralization, artery wall, lung	±	0			1			0			1		
	Total	0			1			0			1		
Metaplasia, osseous, focal, alveolus	±	0			1			1			1		
	Total	0			1			1			1		
(Thyroid gland)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]
Ectopic thymus	±	0			1			0			0		
	Total	0			1			0			0		
(Spleen)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]
Hematopoiesis, extramedullary	±	1			2			0			0		
	+	2			3			1			2		
	++	2			0			4			3		
	Total	5			5			5			5		
Deposit, pigment, brown	+	2			1			4			3		
	++	3			4			1			2		
	Total	5			5			5			5		

a) satellite group
 Grade of histopathological finding; ±:very slight, +:slight, ++:moderate.
 Total:total number of animals with positive grade.

Table 6 Estrous cycle and reproductive performance in rats treated orally with 4,4'-biphenyldiol in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		8		40		200	
Estrous cycle								
Type of cycle during pre-treatment period								
4-day cycle	12		12		12		12	
Length of estrous cycle in days	4.0 ± 0.0	(12)	4.0 ± 0.0	(12)	4.0 ± 0.0	(12)	4.0 ± 0.0	(12)
Type of cycle during treatment period								
4-day cycle	12		11		12		12	
4-day and 5-day cycle	0		1		0		0	
Length of estrous cycle in days	4.0 ± 0.0	(12)	4.0 ± 0.1	(12)	4.0 ± 0.0	(12)	4.0 ± 0.0	(12)
Frequency of animals of which type of cycle was changed after the treatment								
	0/12		1/12		0/12		0/12	
Reproductive performance								
Number of mated pairs	12		12		12		12	
Number of copulated pairs	11		11		12		12	
Copulation index ^{a)}	91.7		91.7		100		100	
Number of pregnant animals	11		11		10		12	
Fertility index ^{b)}	100		100		83.3		100	
Pairing days until copulation	2.5 ± 1.1	(11)	2.6 ± 1.2	(11)	2.7 ± 0.8	(12)	2.7 ± 1.2	(12)
Frequency of vaginal estrus	1.0 ± 0.0	(11)	1.0 ± 0.0	(11)	1.0 ± 0.0	(12)	1.0 ± 0.0	(12)

Values represent mean ± S.D., and parentheses indicate the number of females evaluated.

a) Copulation index = (Number of copulated pairs/Number of mated pairs) × 100, %

b) Fertility index = (Number of pregnant females/Number of copulated pairs) × 100, %

Table 7 Summary of development of pups from dams treated orally with 4,4'-biphenyldiol in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		8		40		200	
Number of pregnant females	11		11		10		12	
Number of pregnant females with pups alive	11		11		10		12	
Gestation index ^{a)}	100		100		100		100	
Gestation length in days	22.4 ± 0.5	(11)	22.4 ± 0.5	(11)	22.0 ± 0.0	(10)	22.4 ± 0.5	(12)
Number of corpora lutea	15.9 ± 1.6	(11)	16.5 ± 1.1	(11)	16.2 ± 1.2	(10)	15.2 ± 1.5	(12)
Number of implantation sites	15.5 ± 1.7	(11)	14.3 ± 3.6	(11)	16.0 ± 1.6	(10)	14.7 ± 1.7	(12)
Implantation index ^{b)}	97.1 ± 4.3	(11)	86.9 ± 21.6	(11)	98.7 ± 4.2	(10)	96.7 ± 5.3	(12)
Day 0 of lactation								
Number of pups born	14.5 ± 2.3	(11)	13.8 ± 4.0	(11)	15.1 ± 1.7	(10)	14.0 ± 1.8	(12)
Delivery index ^{c)}	93.2 ± 6.9	(11)	94.6 ± 12.2	(11)	94.4 ± 4.8	(10)	95.5 ± 5.2	(12)
Number of pups alive	14.3 ± 2.3	(11)	13.8 ± 4.0	(11)	14.6 ± 1.6	(10)	12.8 ± 2.9	(12)
Birth index ^{d)}	92.0 ± 7.6	(11)	94.6 ± 12.2	(11)	91.5 ± 8.1	(10)	88.8 ± 20.1	(12)
Live birth index ^{e)}	98.7 ± 3.0	(11)	100.0 ± 0.0	(11)	97.0 ± 7.5	(10)	93.3 ± 20.8	(12)
Pups weight in grams								
Male	6.8 ± 0.8	(11)	6.9 ± 0.8	(11)	6.5 ± 0.5	(10)	6.6 ± 0.8	(12)
Female	6.6 ± 0.6	(11)	6.6 ± 0.7	(11)	6.0 ± 0.4	(10)	6.2 ± 0.8	(12)
Sex ratio on day 0 ^{f)}	1.4 ± 0.7	(11)	1.4 ± 1.5	(11)	1.3 ± 0.7	(10)	1.3 ± 0.8	(12)
Day 4 of lactation								
Number of pups alive	13.9 ± 2.1	(11)	13.6 ± 4.0	(11)	14.5 ± 1.5	(10)	12.4 ± 4.2	(12)
Viability index ^{g)}	97.7 ± 4.0	(11)	98.8 ± 2.6	(11)	99.4 ± 2.0	(10)	91.7 ± 28.9	(12)
Pups weight in grams								
Male	10.6 ± 1.7	(11)	10.7 ± 1.1	(11)	10.2 ± 1.1	(10)	10.8 ± 1.0	(11)
Female	10.3 ± 1.4	(11)	10.4 ± 1.4	(11)	9.8 ± 1.0	(10)	10.0 ± 0.9	(11)
Sex ratio on day 4 ^{h)}	1.4 ± 0.7	(11)	1.4 ± 1.5	(11)	1.3 ± 0.7	(10)	1.2 ± 0.8	(11)

Values represent mean ± S.D., and parentheses indicate the number of litters evaluated.

- a) Gestation index = (Number of females with alive pups / Number of pregnant females) × 100, %
- b) Implantation index = (Number of implantation sites / Number of corpora lutea) × 100, %
- c) Delivery index = (Number of pups born / Number of implantation sites) × 100, %
- d) Birth index = (Number of live pups on day 0 / Number of implantation sites) × 100, %
- e) Live birth index = (Number of live pups on day 0 / Number of pups born) × 100, %
- f) Sex ratio on day 0 = Number of male live pups on day 0 / Number of female live pups on day 0
- g) Viability index = (Number of live pups on day 4 / Number of live pups on day 0) × 100, %
- h) Sex ratio on day 4 = Number of male live pups on day 4 / Number of female live pups on day 4