



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最 終 報 告 書

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸のラットを用いた
経口投与による反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験

R-675

目 次

	頁
要 約	1
緒 言	3
試験材料および方法	4
1. 被験物質および媒体	4
1) 被験物質	4
2) 媒体	4
3) 被験液の調製および濃度確認	4
2. 試験動物	5
3. 飼育条件	5
4. 個体識別およびケージへの表示	6
5. 投与量、群構成および動物数	6
6. 投与量とその設定根拠	6
7. 投与経路、投与方法および投与期間	7
8. 観察、測定、検査の方法および頻度	7
1) 雄 (P)	7
(1) 一般状態の観察	7
(2) 体重測定	8
(3) 摂餌量測定	8
(4) 血液学検査	8
(5) 血液化学検査	9
(6) 剖検	10
(7) 器官重量測定	11
(8) 骨髓像検査	11
(9) 病理組織学的検査	11
(10) 精細管のステージ分類	11

	頁
2) 雌 (P)	1 1
(1) 一般状態の観察	1 1
(2) 性周期の観察	1 1
(3) 体重測定	1 1
(4) 摂餌量測定	1 2
(5) 分娩および哺育観察	1 2
(6) 剖検	1 2
(7) 器官重量測定	1 2
(8) 病理組織学的検査	1 2
3) 親動物 (P) の交配	1 3
4) 新生児 (F ₁)	1 3
(1) 出生児の観察	1 3
(2) 哺育児の観察および測定	1 3
9. 統計学的方法	1 3
1) 多重検定	1 3
2) Wilcoxon の順位和検定	1 4
3) χ^2 検定	1 4
4) Mann - Whitney の U 検定	1 4
5) 各種データの算出式	1 4
試験結果	1 5
I. 反復投与毒性	1 5
1. 雄 (P) に及ぼす影響	1 5
1) 一般状態	1 5
2) 体重	1 5
3) 摂餌量	1 5
4) 血液学検査	1 6
5) 骨髓像検査	1 6
6) 血液化学検査	1 6
7) 剖検所見	1 6

	頁
8) 器官重量	1 6
9) 病理組織学的検査	1 6
10) 精細管のステージ分類	1 8
2. 雌 (P) に及ぼす影響	1 8
1) 一般状態	1 8
2) 体重	1 9
3) 摂餌量	1 9
4) 剖検所見	1 9
5) 器官重量	1 9
6) 病理組織学的検査	2 0
II. 生殖発生毒性	2 1
1. 親動物 (P) に及ぼす影響	2 1
1) 性周期	2 1
2) 交尾率および受胎率	2 1
3) 新生児出産雌数、妊娠期間、分娩および哺育状態	2 2
4) 黄体数、着床痕数、着床率および新生児出産数	2 2
2. 新生児 (F ₁) に及ぼす影響	2 2
1) 性比、外表異常および生存率	2 2
2) 体重	2 3
3) 剖検所見	2 3
考 察	2 4
文 献	2 7

Figures and Tables

Figure 1	Body weights changes of males
Figure 2	Food consumption of males
Figure 3	Body weights changes of females
Figure 4	Food consumption of females
Table 1、2	Clinical signs of males
Table 3	Body weights of males
Table 4	Food consumption of males
Table 5、6	Hematological examination of males
Table 7	Myelogram examination of males
Table 8~10	Blood chemical examination of males
Table 11	Gross pathological findings of males
Table 12、13	Absolute organ weights of males
Table 14、15	Relative organ weights of males
Table 16~18	Histopathological findings of males
Table 19	Staging of seminiferous tubules of males

Table 20	Clinical signs of females
Table 21、22	Clinical signs of dams
Table 23	Body weights of females
Table 24	Body weights of dams
Table 25	Food consumption of females
Table 26	Food consumption of dams
Table 27	Gross pathological findings of dams
Table 28	Absolute organ weights of dams
Table 29	Relative organ weights of dams
Table 30~34	Histopathological findings of females
Table 35	Estrous cycle
Table 36	Reproductive performance of males and females
Table 37	Findings of delivery on dams
Table 38	Findings of pups
Table 39	Body weights of pups
Table 40	Gross pathological findings of pups

要 約

OECDによる既存化学物質の安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸のラットを用いた経口投与による反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験を行った。すなわち、2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の0（注射用水）、175、350および700mg/kgの用量をSprague-Dawley系ラット（Crj:CD）に、雄は交配開始14日前から交配期間を経て剖検前日までの計49あるいは50日間、雌は交配開始14日前から交配期間、交尾成立後の妊娠期間および分娩を経て哺育3日までの計41～48日間経口投与し、反復投与による雌雄動物における一般毒性学的な影響を検索するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩・哺育などの生殖能力、次世代の発生および発育に及ぼす影響について検索した。

I. 反復投与毒性

1. 雄（P）に及ぼす影響

700mg/kg投与群において、一般状態で喘鳴、一部が黒色を呈する軟便、腹部膨満、肛門周囲の汚染および粗毛、体重で増加抑制、摂餌量で低値が認められた。また、血液学検査で平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の低値、血液化学検査で総蛋白質および α_1 -グロブリン分画比率の低値が認められた。さらに病理学検査において、肉眼的に胃の境界縁の肥厚、腺胃の暗赤色点と糜爛、組織学的に境界縁粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮、腺胃の糜爛と表層性出血がみられた。骨髓像検査および精細管のステージ分類には被験物質投与の影響は認められなかった。350mg/kg投与群においては、病理学検査で肉眼的に胃の境界縁の肥厚、組織学的に境界縁粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮がみられた。一般状態、体重、摂餌量、血液学検査、骨髓像検査および血液化学検査には被験物質投与の影響は認められなかった。175mg/kg投与群においては、一般状態、体重、摂餌量、血液学検査、骨髓像検査、血液化学検査および病理学検査のいずれにも被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 雌（P）に及ぼす影響

700mg/kg投与群において、一般状態で雄と同様の症状に加え、耳介の蒼白化、消瘦、立毛、自発運動の減少、体温低下、呼吸数の減少を呈した後、2例が死亡または切迫屠殺された。また、体重で増加の抑制傾向、病理学検査で肉眼的に胃の境界縁の肥厚、腺胃の

暗赤色点散在と一部陥凹、組織学的に境界縁粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮、腺胃の糜爛と表層性出血がみられた。摂餌量には被験物質投与の影響は認められなかった。350 mg/kg投与群においては、病理学検査で組織学的に境界縁粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮がみられた。175 mg/kg投与群においては、一般状態、体重、摂餌量および病理学検査のいずれにも被験物質投与の影響は認められなかった。

以上の如く、本試験条件下における一般毒性学的な無影響量は雌雄ともに 175 mg/kg/day と推定される。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物（P）の生殖発生毒性に及ぼす影響

700 mg/kg投与群においても、雌の性周期および発情期像発現回数、雌雄の交尾までに要した日数、交尾率および受胎率、雌の妊娠期間、出産率、分娩および哺育状態、さらには黄体数、着床痕数および着床率、新生児出産数および分娩率のいずれにも被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 新生児（F₁）に及ぼす影響

700 mg/kg投与群において、雌雄体重の低値傾向と生後4日における生存率に低値傾向が認められた。しかし、哺育0日の生存児数、死産児数および出生率、性比に被験物質投与の影響は認められず、外表異常児もみられなかった。また、生後4日における剖検においても異常は認められなかった。

以上の如く、本試験条件下における生殖発生毒性的な無影響量は雌雄ともに 700 mg/kg/day、新生児で 350 mg/kg/day と推定される。

緒 言

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸は蛍光染料中間体として広く使用されている。

本試験は、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、厚生省生活衛生局の依頼により、本化学物質がヒトに継続的に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD Guideline for testing of Chemicals, Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test に従って実施した。すなわち、2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸を雌雄ラットに1日1回、雄には交配開始14日前から交配期間を経て剖検前日までの計49あるいは50日間、雌には交配開始14日前から交配期間、交尾成立後の妊娠期間および分娩を経て哺育3日までの計41～48日間経口投与し、反復投与による雌雄動物における一般毒性学的な影響を検索するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩・哺育などの生殖能力、次世代の発生および発育に及ぼす影響について検索した。

なお、本試験は「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について（昭和59年3月31日；環保業第39号環境庁企画調整局長、薬発第229号厚生省生活衛生局長、59基局第85号通商産業省基礎産業局長連名通知）一部改正（昭和63年11月18日環企研第233号、衛生38、63基局823）」に定める「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設に関する基準」に基づいて実施した。

試験材料および方法

1. 被験物質および媒体

1) 被験物質

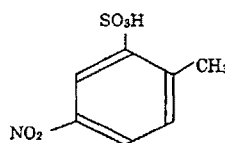
被験物質である 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸は
より提供された。被験物質の情報を以下に示した。

製 造 者 :

名 称 : 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸
(2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid)

CAS 番号 : 121-03-9

構造式または示性式:



ロット番号 :

純 度 : 79.60 %

性 状 : 淡黄色固体 (顆粒状)

分 子 量 : 217.2

融 点 : 133.5 °C 以下

保 存 方 法 : 冷暗所保存

なお、被験物質約 5 g を保管試料として株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所被験物質保管室に保管し、動物試験終了後に残余の被験物質は製造元である

に送付し、分析を依頼した。その結果、品質に問題がないことが確認された (Attached Data 1)。

2) 媒 体

媒 体 名 : 注射用水 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場)

ロット番号 : 6 J 8 3

保 存 方 法 : 室温保存

3) 被験液の調製および濃度確認

各投与群ごとに被験物質の必要量を秤取し、注射用水に溶解して必要濃度に調製し

た。なお、被験物質は換算係数1.256 で純度換算した量を採取した。本被験物質の1～20%の注射用水溶解液は、室温24時間後および冷蔵（4℃）8日間保存後更に室温24時間保存後において安定であることが確認されている（Attached data 2）ことから、調製は1週間に1回以上の頻度で行った。調製後の被験液は、1日分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、冷蔵、暗所保存した。なお、対照群の投与液（注射用水）も同様に保存した。

被験液の濃度確認は雌雄の投与開始前および雄の投与最終週の2回、投与に使用した各濃度液についてHPLC法により株式会社ボゾリサーチセンターで実施した結果、いずれも表示値に対する割合は98～101%の範囲であり、濃度は適切であった（Attached data 3、4）。

2. 試験動物

Sprague-Dawley 系SPFラット〔Crj:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社〕の雌雄各62匹（注文匹数：各60匹）を7週齢で入手し、1週間検疫・馴化飼育した後、雄は一般状態に異常がなく、体重増加が良好な動物48匹を選び8週齢で投与を開始した。雌は全動物の膣スメアを採取して性周期を観察し、性周期に異常がなく、体重増加が良好で一般状態に異常が認められない動物48匹を選び8週齢で投与を開始した。なお、投与開始時の体重範囲は雄で309～335g、雌で202～232gであった。

3. 飼育条件

動物は、検疫・馴化および動物試験期間を通して温度20～24.5℃、相対湿度40.5～71.5%、換気回数1時間10～15回、照明1日12時間（午前7時～午後7時）の飼育室（910号室）で飼育した。

動物は、交配期間および妊娠17日から哺育4日までの期間を除き、金属製網ケージ（W 410×D 350×H 170mm：リードエンジニアリング株式会社）を仕切り板で2つに区切りそれぞれ個別に収容した。交配期間中は夕方から翌朝までの間は金属製網ケージ（W 410×D 350×H 170mm：リードエンジニアリング株式会社）に仕切りをせずに雌雄各1匹の計2匹を収容した。雌については妊娠17日から哺育4日までの間は、木屑（ホワイトフレーク：日本チャールス・リバー株式会社）を入れたプラスチック製エコンケージ（W 340×D 400×H 185mm：日本クレア株式会社）で個別飼育した。いずれも固型飼料（放射線滅菌飼料NMF：オリエンタル酵母工業株式会社）および飲料水（御殿場市営

水道水：自動給水装置使用）を自由に摂取させた。なお、プラスチック製エコンケージによる飼育期間中の給水は、給水瓶を用いて行った。

飼料および床敷中の汚染物質の分析は、財団法人日本食品分析センターで実施した分析データを、飲料水の分析は、水道法に準拠した水質の分析を財団法人静岡県生活科学検査センターに定期的（年4回）に依頼し、得られたデータをそれぞれ入手し、本試験の成績に影響のないことを確認し、保管した。

4. 個体識別およびケージへの表示

動物は、検疫・馴化期間中に耳標をつけて個体識別を行った。また、飼育ケージには投与量ごとに色分けしたケージラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号および耳標番号を明記した。

5. 投与量、群構成および動物数

群構成は、被験物質投与群に対照群を加え4群構成とし、1群の動物数は雌雄各12匹とした。群分けは、群分け当日の体重、検疫・馴化期間中の一般状態、増体重、性周期の観察結果により動物を選択した後、当日の体重で層別化し、各群の平均体重ができるだけ均一となるようコンピュータを用いたブロック配置法および無作為抽出法の組合せ（ブロック配置法で必要な群を構成し、投与量および群内の個体番号を無作為に割り当てる）により実施した。群分けは投与開始日に行った。群分け後の余剰動物はエーテル深麻酔により安楽死させた。投与量および群構成表を下表に示す。

群	投与量 (mg/kg)	投 与 液 濃度 (‰)	雄		雌	
			動物数	動 物 番 号	動物数	動 物 番 号
対 照 群	0	0	12	1001～1012	12	1101～1112
低 用 量 群	175	3.5	12	2001～2012	12	2101～2112
中 用 量 群	350	7	12	3001～3012	12	3101～3112
高 用 量 群	700	14	12	4001～4012	12	4101～4112

6. 投与量とその設定根拠

投与量は、ラットを用いた急性毒性試験（投与量：0、500、1000および2000mg/kg）および2週間経口投与予備試験（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：U-

1237、投与量：0、175、350 および 700mg/kg) の結果を参考にして決定した。すなわち、急性毒性試験では、500mg/kg投与群の雌雄に死亡例はみられなかったが、1000mg/kg投与群の雌雄各5例中1例と2000mg/kg投与群の雄5例全例と雌5例中4例が死亡し、生存した1000mg/kg投与群の雌雄および2000mg/kg投与群の雌1例には腺胃部の潰瘍と暗赤色点あるいは境界縁の肥厚がみられた。2週間の経口投与では、700mg/kg投与群の雌雄で喘鳴および境界縁の肥厚、雄で腺胃部の暗赤色点、さらに雌で腎臓重量の高値がみられた。350mg/kg以下の投与群では毒性徴候はみられなかった。これらの結果から、本試験の高用量は、毒性徴候は示すものの死亡や重篤な苦痛を示さないと推定される700mg/kgとし、以下公比2で減じて350mg/kgを中用量に、175mg/kgを低用量に設定した。

7. 投与経路、投与方法および投与期間

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸は、継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられること、また、OECD Guideline for testing of Chemicals、Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Testに従い経口投与を選択した。投与期間は、上記のガイドラインに従って、雄は交配前14日間およびその後剖検前日までの49あるいは50日間、雌では交配前14日間、交配期間（最長14日間）、妊娠期間および哺育3日（剖検前日）までの41～48日間とし、1日1回、09:00～15:00の間に金属製胃ソングを用いて強制経口投与した。対照群には媒体（注射用水）のみを同様に投与した。投与容量は0.5ml/100g体重とし、個体毎の投与液量は、雄は各測定日の体重を、雌については交配前および交配期間中は各測定日の体重、妊娠期間中は妊娠0日、7日、14日および21日の体重、授乳期間中は哺育0日の体重を基準に算出した。

8. 観察、測定、検査の方法および頻度

1) 雄 (P)

(1) 一般状態の観察

一般状態の観察は毎日、投与前、投与直後および投与2時間後の1日3回、中毒症状および行動異常の有無を観察した。但し、休日の観察は投与前および投与直後の2回とし、剖検日は剖検前1回とした。

(2) 体重測定

体重は、投与開始日（投与1日の投与前）、投与4日、8日、11日、15日、22日、29日、36日、43日、49日および剖検日（投与開始後50および51日）の08:00~12:30の間に測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配期間と剖検日を除く、体重測定と同じ日の08:00~12:30の間に摂餌残量を測定し、前日の給餌量との差から1日摂取量を算出した。

(4) 血液学検査

投与期間終了翌日の屠殺剖検時に前日より一夜（約16時間）絶食させた全生存動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から採血した。

①腹大動脈から抗凝固剤（EDTA-2K）を加えた採血ビン（SB-41：東亜医用電子株式会社）に採取した血液を用いて以下の測定を行った。

検査項目	測定方法
赤血球数（RBC）	電気抵抗変化検出法 ^{a)}
ヘモグロビン量（Hb）	シアンメトヘモグロビン法 ^{a)}
メトヘモグロビン量（met Hb）	Van Assendelft 法 ^{b)}
ヘマトクリット値（Ht）	
	$\frac{\text{平均赤血球容積} (\mu^3) \times \text{赤血球数} (10^4 / \text{mm}^3)}{10^3} \text{ } ^{a)}$
平均赤血球容積（MCV）	電気抵抗変化検出法 ^{a)}
平均赤血球血色素量（MCH）	$\frac{\text{ヘモグロビン量} (\text{g} / \text{dL}) \times 10^{a)}}{\text{赤血球数} (10^6 / \text{mm}^3)}$
平均赤血球血色素濃度（MCHC）	$\frac{\text{ヘモグロビン量} (\text{g} / \text{dL}) \times 10^{a)}}{\text{ヘマトクリット値} (\%)}$
網赤血球率	Brecher法
血小板数	電気抵抗変化検出法 ^{a)}
白血球数（WBC）	電気抵抗変化検出法 ^{a)}

検査項目測定方法

白血球百分率

May-Giemsa 染色による鏡検法

②採取した血液を3.8 %クエン酸ナトリウムを加えた試験管にとり、遠心分離（3000 rpm、10分間）後、得られた血漿を用いて以下の測定を行った。

検査項目測定方法

プロトロンビン時間（PT）

クロット法^{a)}

活性化部分トロンボプラスチン時間
（APTT）

クロット法^{a)}

フィブリノーゲン量

トロンボプラスチン法^{a)}

使用測定機器

- a) コールター全自動8項目血球アナライザー T890（株式会社日科機）
- b) 分光光度計 UVIDE C-66（株式会社 日本分光メディカル）
- c) 血液凝固自動測定装置 ACL100（Instrumentation Laboratory）

(5) 血液化学検査

血液学検査のための採血と同時に腹大動脈から採取した血液を用いて、以下の検査を行った。

①採取した血液を試験管にとり遠心分離（3000 rpm、10分間）し、得られた血清を用いて以下の測定を行った。

検査項目測定方法

ALP

Bessey - Lowry法^{d)}

総コレステロール（T.cho）

CEH-COD-POD法^{d)}

トリグリセライド（TG）

GK-GPO-POD法^{d)}

リン脂質（PL）

PLD-ChOD-POD法^{d)}

鉄（Fe）

クロマズロールB法^{d)}

総鉄結合能（TIBC）

クロマズロールB法^{d)}

不飽和鉄結合能（UIBC）

鉄および総鉄結合能から算出

検査項目	測定方法
総ビリルビン (T. bilirubin)	アゾビリルビン法 ^{d)}
血糖	Hexokinase - G 6 P D 法 ^{d)}
尿素窒素 (B U N)	U rease - G L D H 法 ^{d)}
クレアチニン	J a f f e 法 ^{d)}
ナトリウム (N a)	イオン選択電極法 ^{d)}
カリウム (K)	イオン選択電極法 ^{d)}
塩素 (C l)	イオン選択電極法 ^{d)}
カルシウム (C a)	O C P C 法 ^{d)}
無機リン (P)	モリブデン酸法 ^{d)}
総蛋白質 (T P)	B i u r e t 法 ^{d)}
A / G 比	蛋白質分画比率から算出
蛋白質分画	セルロースアセテート膜による電気泳動法 ^{e)}

②腹大動脈からヘパリンを加えた容器に採取した血液を遠心分離 (3000rpm、10分間) し、得られた血漿を用いて以下の測定を行った。

検査項目	測定方法
G O T	U V - r a t e 法 ^{d)}
G P T	U V - r a t e 法 ^{d)}
L D H	U V - r a t e 法 ^{d)}

使用測定機器

d) 全自動分析装置 Monarch (Instrumentation Laboratory)

e) 全自動電気泳動装置 CLINISCAN SA-V

(株式会社ヘレナ研究所)

(6) 剖検

全生存動物を最終投与の翌日 (投与開始後50日:各群1~6番、投与開始後51日:各群7~12番) に体重を測定した後、エーテル麻酔下で採血し、剖検した。さらに、脳、心臓、気管支を含む肺、胃、肝臓、下垂体、上皮小体を含む甲状腺、副

腎、胸腺、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体および肉眼的異常部位を採取し、精巣および精巣上体はブアン液に、その他の器官および組織はリン酸緩衝液（1/15M、pH 7.1～7.4）で調製した10%ホルマリン液に固定した。

(7) 器官重量測定

器官重量は、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体について測定し、最終体重から相対器官重量を算出した。

(8) 骨髓像検査

生存例全例について大腿骨骨髓を採取し、May-Gimsa染色標本を作製し、対照群と全用量群について検査した。

(9) 病理組織学的検査

全動物について、脳、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、精巣上体および胃をパラフィン包埋した。そのうち、胃については、被験物質投与の影響が疑われたため対照群と全用量群について、その他の器官・組織は対照群と高用量群について、また、剖検時の肉眼的異常部位は用量に関係なく、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。

(10) 精細管のステージ分類

精巣および精巣上体については、ヘマトキシリン・エオジン染色とは別にPAS染色を行い対照群と高用量群を鏡検するとともに、精細管のステージをI～VI、VII～VIII、IX～XIおよびXII～XIVに分類した。

2) 雌 (P)

(1) 一般状態の観察

一般状態の観察は毎日、投与前、投与直後および投与2時間後の1日3回、中毒症状および行動異常の有無を観察した。但し、休日の観察は投与前および投与直後の2回とし、剖検日は剖検前1回とした。

(2) 性周期の観察

性周期の観察は、投与開始翌日から交尾が確認されるまで毎日膣スメアを採取し、鏡検した。交配前の投与期間中は膣スメア像を発情前期、発情期、発情後期および発情休止期に分類し、発情期像発現回数および発情期から次の発情期までの日数（性周期）を調べた。なお、交配期間中は膣スメア内の精子の有無を調べた。

(3) 体重測定

体重は、投与開始日（投与1日の投与前）、投与4日、8日、11日および15日、

交配期間中は投与22日、妊娠期間中は妊娠0日、7日、14日および21日、哺育期間中は哺育0日および4日の08:00~12:30の間に測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は、交配前は体重測定と同じ日、妊娠期間中は妊娠1日、7日、14日および21日、哺育期間中は哺育1日および4日の08:00~12:30の間に摂餌残量を測定し、前日の給餌量との差から1日摂取量を算出した。

(5) 分娩および哺育観察

母動物は自然分娩させ、分娩異常の有無を観察した。分娩終了の確認は妊娠21日から妊娠24日まで毎日午前、午後の2回、妊娠25日は午前1回行い、分娩が10:30までに終了していた場合、その日を哺育0日とした。午後に分娩した場合は、翌日を哺育0日とした。交尾確認後25日の10:30までに分娩がみられなかった対照群の2例(No. 1108、1110)、350mg/kg投与群の1例(No. 3102)および700mg/kg投与群の1例(No. 4108)については、エーテル麻酔下で放血致死させた後に剖検し、妊娠の成否を確認したところ、子宮内に着床が認められなかったため、不妊と判断した。

分娩終了が確認された母動物については出生児を哺育させ、巣作り、児集め、授乳の有無を指標として哺育状態の観察を哺育4日まで毎日行った。

(6) 剖検

哺育4日に母動物全例をエーテル麻酔下で放血致死させた後に剖検し、黄体数および着床痕数を数えた。さらに、脳、心臓、気管支を含む肺、胃、肝臓、下垂体、上皮小体を含む甲状腺、副腎、胸腺、脾臓、腎臓、卵巣、子宮、腔を採取し、リン酸緩衝液(1/15M、pH 7.1~7.4)で調製した10%ホルマリン液に固定した。不妊動物および700mg/kg投与群の死亡動物1例(No. 4110)と切迫屠殺動物1例(No. 4112)についても同様に処置した。

(7) 器官重量測定

器官重量は、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および卵巣について測定し、最終体重から相対器官重量を算出した。

(8) 病理組織学的検査

全動物について、脳、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、卵巣および胃をパラフィン包埋した。そのうち、胃については、被験物質投与の影響が疑われたため対照群と全用量群について、その他の器官・組織は対照群と高用量群について、また、剖検時の

肉眼的異常部位は用量に関係なく、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。

3) 親動物 (P) の交配

交配前に14日間にわたって投与した後、同一群内の雌雄を1対1の組み合わせで、終夜同居させた。同居期間は最長14日間として、交尾が確認されるまでとした。交尾の確認は毎朝、膣栓形成あるいは膣垢中の精子の有無により行い、これらが確認された雌を交尾動物として、その日を妊娠0日とした。なお、700mg/kg投与群で交配期間中に雌1例 (No. 4110) が死亡したため、交配相手の雄 (No. 4010) は無処置雌 (Tag No. 453) と交配させた。

4) 新生児 (F₁)

(1) 出生児の観察

哺育0日に生存児数、死産児数を数え、外表異常の有無を観察した。生存児は性別を判定し、体重を測定した後に全例を母動物に哺育させた。また、死産児は喰損の著しいものを除いてリン酸緩衝液 (1/15M、pH 7.1~7.4) で調製した10%ホルマリン液に固定し、保存した。

(2) 哺育児の観察および測定

哺育児については、生死の観察を毎日1回行った。体重は、哺育0日 (出生日) および4日に測定した。哺育4日に全哺育児をエーテル麻酔下で放血致死させた後、剖検した。

9. 統計学的方法

統計学的方法は次の検定法を用いて行い、有意水準は5および1%とした。なお、児は一腹の平均を一単位とした。

1) 多重検定

Bartlett法により各群の分散の均一性の検定を行った。その結果、分散が均一の場合には一元配置法による分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合、Dunnett法を用いて対照群と各投与群との一対比較検定を行った。分散が均一でない場合には、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、有意であれば対照群と各投与群との平均順位の差について、Dunnett型の検定を行った。

体重、摂餌量、発情期像発現回数、性周期、同居日数、妊娠期間、血液学検査値、血液化学検査値、骨髓像検査値、器官重量、黄体数、着床痕数、出生児数、着床率、性比、

分娩率、出生率、新生児生存率

2) Wilcoxon の順位和検定

精細管のステージ分類の検査値

3) χ^2 検定

交尾率、受胎率、出産率

4) Mann - Whitney の U 検定

病理組織学的検査における所見の発現頻度および程度の増強について行った。

5) 各種データの算出式

交尾率 (%) = (交尾確認動物数 / 交配動物数) × 100

受胎率 (%) = (妊娠動物数 / 交尾確認動物数) × 100

出産率 (%) = (生児出産母動物数 / 妊娠母動物数) × 100

妊娠期間 (日) = 哺育 0 日 (分娩確認日) - 妊娠 0 日

性 比 = 雄 / (雄 + 雌)

新生児生存率 (%) = (哺育 4 日の生存児数 / 哺育 0 日の生児数) × 100

分娩率 (%) = (総出産児数 / 着床痕数) × 100

出生率 (%) = (哺育 0 日の生存児数 / 総出産児数) × 100

着床率 (%) = (着床痕数 / 黄体数) × 100

試験結果

I. 反復投与毒性

1. 雄 (P) に及ぼす影響

1) 一般状態 (Table 1、2、Appendix 1~8)

投与期間中、各群に死亡動物はみられなかったが、700mg/kg投与群の4例 (No. 4007、4010、4011、4012) に下表に示す症状が観察された。

動物番号	症 状 と そ の 発 現 状 況	
4007	投与19~22日	喘鳴
4010	投与18日	軟便 (一部が黒色を呈する)
	投与19~23日	喘鳴
4011	投与17~42日	喘鳴
	投与19日	腹部膨満
	投与19~21日	肛門周囲の汚染
	投与27~42日	粗毛
4012	投与20~23、31、50、51日	喘鳴

350mg/kg以下の投与群において異常症状は観察されなかった。

2) 体重 (Figure 1、Table 3、Appendix 9~12)

700mg/kg投与群において体重増加の抑制が投与4日以降みられ、投与15日以降は対照群に比べ有意な低値が認められた。また、同群の投与期間中の体重増加量は有意に低かった。350mg/kg以下の投与群の体重は投与期間を通じて対照群とほぼ同様に推移し、各測定日の体重および投与期間中の体重増加量には対照群と各被験物質投与群の間に差は認められなかった。

3) 摂餌量 (Figure 2、Table 4、Appendix 13~16)

700mg/kg投与群において摂餌量の低値傾向が投与29および36日に、有意な低値が投与43日に認められた。350mg/kg以下の投与群では投与期間を通じて対照群とほぼ同様の値を示し、各測定日の摂餌量には対照群と各被験物質投与群の間に差は認められなかった。

4) 血液学検査 (Table 5、6、Appendix 17～24)

700mg/kg投与群において平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の有意な低値が認められた。350mg/kg以下の投与群ではいずれの検査項目も対照群とほぼ同様な値を示し、対照群と各被験物質投与群の間に差は認められなかった。

5) 骨髓像検査 (Table 7、Appendix 25～28)

投与期間終了 (投与49または50日) の翌日の剖検時に行った。

赤血球系細胞比率および骨髓球系細胞比率ならびにM/E比は対照群と各被験物質投与群の間に差は認められなかった。

6) 血液化学検査 (Table 8～10、Appendix 29～40)

投与期間終了 (投与49または50日) の翌日の剖検時に行った。

700mg/kg投与群において総蛋白質に有意な低値がみられ、蛋白分画における α_1 -グロブリン分画比率に有意な低値が認められた。また、同群の血清鉄に有意な高値が認められた。350mg/kg以下の投与群ではいずれの検査項目においても対照群と各被験物質投与群の間に差は認められなかった。

7) 剖検所見 (Table 11、Appendix 41～44)

胃の境界縁の肥厚が350mg/kg投与群の1例 (No. 3001) および700mg/kg投与群の9例 (No. 4001、4002、4003、4005、4006、4007、4008、4009、4012) においてみられた。また、上記変化のみられた700mg/kg投与群の1例 (No. 4003) では腺胃の暗赤色点、他の1例 (No. 4008) では腺胃の糜爛も併発していた。

その他、700mg/kg投与群で肺の一部褐色化が1例 (No. 4011)、胸腺の萎縮が1例 (No. 4012)、対照群で腎臓の一部陥凹 (片側性) が1例 (No. 1004)、精巣上体の尾部結節 (片側性) が1例 (No. 1006) みられた。

8) 器官重量 (Table 12～15、Appendix 45～60)

両側性の器官については左右の合計値で評価した。

700mg/kg投与群において肝臓の絶対重量の有意な低値、腎臓、精巣および精巣上体の相対重量の有意な高値が認められた。350mg/kg以下の投与群では測定したいずれの器官・組織の絶対重量および相対重量にも対照群と各被験物質投与群の間に差は認められなかった。

9) 病理組織学的検査 (Table 16～18、Appendix 61～66)

被験物質投与の影響が疑われた胃については、対照群および全用量群を、その他の脳、心臓、肝臓、副腎、脾臓、腎臓、精巣および精巣上体については、対照群と700

mg/kg投与群を検査した。また、700mg/kg投与群の肉眼的異常部位についても検査した。

胃 : ごく軽度または軽度の境界縁粘膜の過形成が 350mg/kg投与群の9例 (No. 3001、3002、3004~3008、3011、3012) と 700mg/kg投与群の11例 (No. 4001~4009、4011、4012) に、ごく軽度または軽度の噴門部粘膜の萎縮が 350mg/kg投与群の9例 (No. 3002~3005、3007~3010、3012) と 700mg/kg投与群の全例に、ごく軽度から中等度の腺胃の糜爛 (糜爛治癒像を含む) が 700mg/kg投与群の6例 (No. 4003~4005、4008、4010、4011) に、ごく軽度または軽度の腺胃の表層性出血が 700mg/kg投与群の5例 (No. 4003、4004、4006、4009、4010) にみられた。これら所見のうち、境界縁粘膜の過形成と噴門部粘膜の萎縮の発現頻度が 350および 700mg/kg投与群で有意に高く、かつその程度は 350mg/kg投与群と比べ 700mg/kg投与群で増強してみられた。また、腺胃の糜爛 (糜爛治癒像を含む) の発現頻度も 700mg/kg投与群で有意に高かった。

その他の器官には以下の所見がみられた。所見の病理組織学的特徴および投与量の増加に伴う発現頻度の増加と程度の増強が認められないことから、すべて被験物質投与との関係はないものと判断した。

心 臓 : ごく軽度の心筋の変性/壊死が 700mg/kg投与群の2例 (No. 4004、4009) にみられた。

肝 臓 : ごく軽度または軽度の小肉芽腫が対照群の5例 (No. 1003、1006、1007、1009、1011) と 700mg/kg投与群の3例 (No. 4001、4003、4005) にみられた。

脾 臓 : ごく軽度または軽度の髄外造血と赤脾髄の褐色色素沈着が対照群および 700mg/kg投与群の全例にみられた。

腎 臓 : 対照群に中等度の皮質における限局性線維化が1例 (No. 1004 : 肉眼的に一部陥凹として認めた個体)、ごく軽度または軽度の尿細管の好塩基性化が2例 (No. 1004、1006)、軽度の尿細管上皮における好酸性小体が1例 (No. 1002) みられた。

精巣上体 : 軽度の精子肉芽腫が対照群の1例 (No. 1006 : 肉眼的に尾部結節として認めた個体) にみられた。

観察したその他の器官には異常所見はみられなかった。

肉眼的異常部位：700mg/kg投与群でみられた肺の一部褐色化（No. 4011）は組織学的に軽度の異物/巨細胞の肉芽腫、胸腺の萎縮（No. 4012）は組織学的にも軽度の萎縮として観察された。

10) 精細管のステージ分類（Table 19、Appendix 67、68）

精細管のステージⅠ～Ⅵ、Ⅶ～Ⅷ、Ⅸ～ⅪおよびⅫ～ⅩⅣの相対的発現頻度は対照群と700mg/kg投与群の間に差は認められなかった。

2. 雌（P）に及ぼす影響

1) 一般状態（Table 20～22、Appendix 69～80）

700mg/kg投与群において交配期間中に1例（No. 4110）死亡を確認し、妊娠期間中に1例（No. 4112）切迫屠殺した。また、700mg/kg投与群の3例（No. 4102、4104、4105）に下表に示す症状が観察された。

動物番号	症 状 と そ の 発 現 状 況			
	交配前投与期間	交 配 期 間	妊 娠 期 間	哺 育 期 間
4102	—	—	妊娠2、6～12日：喘鳴	分娩後3、4日：喘鳴、乳頭の未発達
4104	投与8日：喘鳴	—	妊娠3～12日：喘鳴	—
4105	—	—	妊娠3日：喘鳴	—
4110 (死亡確認)	—	投与19～26日：喘鳴 投与22、26日：軟便（一部が黒色を呈する） 投与23日：耳介の蒼白化 投与24～26日：肛門周囲の汚染、削瘦 投与27日：死亡確認		
4112 (切迫屠殺)	投与12日：喘鳴	—	妊娠3～5日：喘鳴、腹部膨満 妊娠4、5日：立毛 妊娠5日：削瘦、自発運動の減少、 体温低下、呼吸数の減少、 切迫屠殺	

なお、剖検では、No. 4110で消瘦、肛門周囲の汚染、胸腺、脾臓および子宮の萎縮および肺の腫大がみられた。

No. 4112で脾臓の萎縮、副腎の腫大、胃および腸管のガス貯留と拡張、腺胃の一部肥厚、消瘦、立毛、腹部膨満がみられた。

350mg/kg以下の投与群において死亡および異常症状は、交配前および交配期間、妊娠期間ならびに哺育期間を通じてみられなかった。

2) 体重 (Figure 3、Table 23、24、Appendix 81~88)

700mg/kg投与群の体重は、交配前投与期間の投与8、11および15日に低値傾向がみられ、当該期間の体重増加量に有意な低値が認められた。同群の体重の低値傾向は妊娠および哺育期間中も継続したが、各測定日の体重および各期間中の体重増加量は対照群との間に有意差は認められなかった。350mg/kg以下の投与群の体重は、交配前、妊娠期間および哺育期間を通じて対照群とほぼ同様に推移し、各測定日の体重および各期間中の体重増加量には対照群と各被験物質投与群の間に差は認められなかった。

3) 摂餌量 (Figure 4、Table 25、26、Appendix 89~96)

350および700mg/kg投与群の摂餌量は交配前、妊娠期間および哺育期間を通じて対照群とほぼ同様の値を示し、各測定日の摂餌量には対照群と各被験物質投与群の間に差は認められなかった。175mg/kg投与群の摂餌量は、妊娠21日に有意な高値が認められたが、その他の期間には対照群と各被験物質投与群の間に差は認められなかった。

4) 剖検所見 (Table 27、Appendix 97~100)

胃の境界縁の肥厚が700mg/kg投与群の2例 (No. 4104、4107) にみられ、うち1例 (No. 4107) には腺胃の暗赤色点散在も併発していた。また、腺胃の一部陥凹が700mg/kg投与群の1例 (No. 4103) にみられた。

その他、腺胃の白色点が350mg/kg投与群の1例 (No. 3104)、肺の暗赤色点が175mg/kg投与群の1例 (No. 2111)、肺の暗赤色が700mg/kg投与群の1例 (No. 4103)、乳頭および乳腺の未発達が700mg/kg投与群の1例 (No. 4102) にみられた。

5) 器官重量 (Table 28、29、Appendix 101~108)

両側性の器官については左右の合計値で評価した。

700mg/kg投与群において、心臓および腎臓の相対重量の有意な増加が認められたが、絶対重量に有意差はなかった。350mg/kg以下の投与群では、測定したいずれの

器官・組織の絶対重量および相対重量にも対照群と各被験物質投与群の間に差は認められなかった。

6) 病理組織学的検査 (Table 30~34、Appendix 109~114)

700mg/kg投与群における死亡動物1例 (No. 4110: 投与27日死亡) と切迫屠殺動物1例 (No. 4112: 妊娠5日切迫屠殺) を検査した。また、被験物質投与の影響が疑われた胃については、対照群および全用量群を、その他の脳、心臓、肝臓、副腎、脾臓、腎臓および卵巣については、対照群と700mg/kg投与群を検査した。さらに、175および700mg/kg投与群の肉眼的異常部位についても検査した。

① 700mg/kg投与群の死亡動物と切迫屠殺動物

No. 4110 (死亡) では、肺に軽度の細気管支周囲における炎症細胞浸潤、胸腺に高度の萎縮、脾臓に中等度の萎縮とごく軽度の赤脾髄における褐色色素沈着、子宮に軽度の萎縮がみられた。

No. 4112 (切迫屠殺) では、胃に高度の腺胃粘膜の壊死、腺胃粘膜下組織の軽度の出血と中等度の浮腫、中等度の腺胃における炎症細胞浸潤およびごく軽度の境界縁の糜爛、十二指腸、空腸および回腸にごく軽度の粘膜萎縮、脾臓に中等度の萎縮とごく軽度の赤脾髄における褐色色素沈着がみられた。

② 生存動物

胃 : ごく軽度または軽度の境界縁粘膜の過形成が350mg/kg投与群の3例 (No. 3101、3106、3108) と700mg/kg投与群の7例 (No. 4104~4109、4111) に、ごく軽度または軽度の噴門部粘膜の萎縮が350mg/kg投与群の3例 (No. 3104、3109、3111) と700mg/kg投与群の全例に、ごく軽度または軽度の腺胃の糜爛 (糜爛治癒像を含む) が700mg/kg投与群の5例 (No. 4102~4104、4108、4111) に、軽度の腺胃の表層性出血が700mg/kg投与群の1例 (No. 4108) にみられた。これら所見のうち、境界縁粘膜の過形成および噴門部粘膜の萎縮の発現頻度が700mg/kg投与群で有意に高かった。その他に軽度の前胃粘膜の限局性過形成が350mg/kg投与群の1例 (No. 3108) にみられたが、発現状況から被験物質投与と関連はないと判断した。

その他に以下の器官に所見がみられた。所見の病理組織学的特徴および投与量の増加に伴う発現頻度の増加と程度の増強が認められないことから、すべて被験物質投与との関係はないものと判断した。

心 臓：軽度の心筋の変性／線維化が対照群と 700mg/kg投与群の各1例（No. 1107、4104）にみられた。

肝 臓：ごく軽度の小肉芽腫が対照群と 700mg/kg投与群の各1例（No. 1108、4108）に、ごく軽度の髄外造血が対照群と 700mg/kg投与群の各2例（No. 1103、1105、4104、4106）にみられた。

脾 臓：ごく軽度または軽度の髄外造血と赤脾髄における褐色色素沈着が対照群と 700mg/kg投与群の全例にみられた。

観察したその他の器官には異常所見はみられなかった。

肉眼的異常部位：175mg/kg投与群でみられた肺の暗赤色点（No. 2111）は組織学的にごく軽度の限局性出血であった。700mg/kg投与群でみられた乳腺の未発達（No. 4102）は組織学的に軽度の未発達、肺の暗赤色点（No. 4103）は組織学的にごく軽度の限局性の炎症細胞浸潤と出血であった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物（P）に及ぼす影響

1) 性周期（Table 35、Appendix 115～118）

被験物質投与群における性周期、すなわち発情期発現回数および発情期から次の発情期までの日数は対照群とほぼ同等であり、対照群と各被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。個体別では、175mg/kg投与群の1例（No. 2101）において投与3日から10日まで休止期が継続して観察されたが、投与11日に性周期は正常となり、交配開始後2日に交尾が認められた。性周期異常例は他にみられないことから、本例の性周期異常は被験物質投与と関連のない偶発的変化と考えられる。

2) 交尾率および受胎率（Table 36、Appendix 119～122）

対照群の1組（No. 1006×No. 1106）が交配開始後6日に、700mg/kg投与群の1組（No. 4011×No. 4111）が交配開始後8日にそれぞれ交尾したが、他の組合せは同居開始後5日以内に交尾し、各群の交尾率は100%であった。また、交尾までに要した平均日数に対照群と各被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。妊娠成立は、対照群の2組（No. 1008×No. 1108、No. 1010×No. 1110）、350mg/kg投与群の1組（No. 3002×No. 3102）および700mg/kg投与群の1組（No. 4008×No. 4108）を除く組合せにおいて認められ、対照群と各被験物質投与群における受胎率に有意差

は認められなかった。

3) 新生児出産雌数、妊娠期間、分娩および哺育状態 (Table 37、Appendix 123~126)

対照群の2例 (No. 1108、1110)、350mg/kg投与群の1例 (No. 3102) および 700mg/kg投与群の1例 (No. 4108) は、交尾成立後25日においても分娩が観察されなかったため剖検した結果、不妊であった。その他の対照群および被験物質投与群では妊娠23日までに分娩終了が確認され、妊娠期間に対照群と各被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。また、分娩異常は観察されず、出産率は各群ともに100%であった。

哺育状態では、対照群および各被験物質投与群のいずれの例においても果作り、児集めおよび授乳などの哺育行動に異常は認められなかった。

4) 黄体数、着床痕数、着床率および新生児出産数 (Table 37、Appendix 123~126)

被験物質投与群における黄体数、着床痕数および着床率は対照群とほぼ同様の値を示し、対照群と各被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。また、死産児は対照群の1母体 (No. 1103) に1例、175mg/kg投与群の1母体 (No. 2105) に1例、350mg/kg投与群の1母体 (No. 3104) に1例みられたのみで、被験物質投与群における出生児数は対照群とほぼ同様の値を示し、出生率および分娩率に対照群と各被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。

2. 新生児 (F₁) に及ぼす影響

1) 性比、外表異常および生存率 (Table 38、Appendix 127~130)

性比には対照群と各被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。新生児の外表観察においては、対照群および各被験物質投与群のいずれにも異常は認められなかった。被験物質投与群における生存児数および出生率は対照群とほぼ同様の値を示し、対照群と各被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。しかし、生後4日までの間に死亡した新生児は、対照群の2母体 (No. 1103、1104) に計2例、175mg/kg投与群の2母体 (No. 2103、2111) に計3例、350mg/kg投与群の4母体 (No. 3104、3106、3107、3108) に計6例および700mg/kg投与群の4母体 (No. 4102、4103、4104、4106) に計19例みられ、700mg/kg投与群の生後4日における生存率に低値傾向が認められた。

2) 体重 (Table 39、Appendix 131~134)

被験物質投与群における出生時および生後4日の体重は、700mg/kg投与群の雌雄ともに低値傾向が認められた。350mg/kg以下の投与群では対照群と各被験物質投与群の間に明らかな差は認められなかった。

3) 剖検所見 (Table 40、Appendix 135~138)

生後4日における剖検において、胃に乳塊がなく、栄養不良の児が700mg/kg投与群の1母体 (No. 4102) に雌雄各1例および350mg/kg投与群の1母体 (No. 3112) に雌1例、胃に乳塊のない児が700mg/kg投与群の1母体 (No. 4109) に雌1例みられた。また、臍ヘルニアが350mg/kg投与群の1母体 (No. 3112) に雄1例みられた。

考 察

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の0(注射用水)、175、350および700 mg/kgの用量をSprague-Dawley系ラット(Crl:CD)に、雄は交配14日前から交配期間を経て剖検前日までの計49あるいは50日間、雌は交配14日前から交配期間、交尾成立後の妊娠期間および分娩を経て哺育3日までの計41~48日間経口投与し、反復投与による雌雄動物における一般毒性学的な影響を検索するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩・哺育などの生殖能力、次世代の発生および発育に及ぼす影響について検索した。

雄(P)の一般毒性学的な影響に関して、一般状態において喘鳴が投与17日以降700 mg/kg投与群の4例にみられた。ついで一部の動物に一部が黒色を呈する軟便、または腹部膨満、肛門周囲の汚染および粗毛がみられた。本剤はウサギの眼に高度、皮膚に中等度の刺激性を有することが知られている¹⁾。したがって、喘鳴は本剤の経口投与時の誤嚥により鼻腔や喉頭への刺激に関連した変化と考えられ、腹部膨満は刺激性の被験液を誤嚥したことによる鼻腔の一時的な閉塞によって過呼吸が生じ空気の嚥下により消化管が拡張したものと推測された。また、肛門周囲の汚染および粗毛は体重が減少していることから全身状態の悪化に起因した変化と考えられ、一部が黒色を呈する軟便は被験物質投与による腺胃の糜爛と表層性出血を反映したものと推測された。

体重および摂餌量では、700mg/kg投与群で投与4日以降に体重増加の抑制がみられ、投与29~43日の摂餌量に低値傾向または低値が認められた。

血液学検査では、700mg/kg投与群で平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の低値が認められた。同群の赤血球数が高値であった1例(No.4012)を除いた場合、前述の変化に加えヘモグロビン量およびヘマトクリット値にも低値(ヘモグロビン量:対照群の15.9g/dlに対し700mg/kg投与群で14.9g/dl、ヘマトクリット値:対照群の46%に対し700mg/kg投与群で44%)がみられ、血清鉄に高値が認められた。しかし、溶血を示唆する明らかな変化はみられず、メトヘモグロビンに異常がみられないことから、胃の障害に関連する変化というよりはむしろ骨髓などにおける血色素の合成に対する被験物質投与の影響が示唆された。なお、鉄欠乏性貧血の程度については、網状赤血球の増加、骨髓像検査における赤血球系細胞比率、M/E比の異常および骨髓に組織学的な異常がないことから、軽度な変化と考えられた。

骨髓像検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。

血液化学検査では、700mg/kg投与群で総蛋白質の低値および蛋白分画における α_1 -グロブリン分画比率の低値が認められたが、肝臓および腎臓に組織学的な異常または機能低下を示唆する変化は認められなかった。

病理学的検査では、肉眼的に350mg/kg以上の投与群で胃の境界縁の肥厚、さらに700mg/kg投与群で腺胃の暗赤色点と糜爛、組織学的に350mg/kg以上の投与群で境界縁粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮、さらに700mg/kg投与群で腺胃の糜爛と表層性出血がみられた。境界縁粘膜の過形成、腺胃の糜爛や潰瘍などは刺激性物質を経口投与した際にしばしばみられることから、胃の変化は本剤の刺激性によるものと考えられた。その他に700mg/kg投与群の肝臓の絶対重量に低値、腎臓、精巣および精巣上体の相対重量に高値が認められたが、絶対あるいは相対重量のみの変化であり、低体重に起因する変化と考えられ、組織学的に異常がないことから、毒性学的な意義はないものと判断した。

精細管のステージ分類には被験物質投与の影響は認められなかった。

雌(P)の一般毒性学的な影響に関しては、一般状態において700mg/kg投与群で1例の死亡を確認し、1例を切迫屠殺した。切迫屠殺動物は体重の減少と摂餌量の低値、喘鳴、腹部膨満の他に全身状態の悪化症状がみられ、肉眼的に消化管のガス貯留と拡張、組織学的に腺胃の出血と浮腫、十二指腸、空腸および回腸の粘膜萎縮がみられた。ラットでは鼻腔を閉塞すると消化管の拡張が生じ、死に至ることが報告されている^{2) 3)}。本試験においても経口投与した刺激性を有する被験液の誤嚥により鼻腔を閉塞することによって過呼吸が生じ、空気の嚥下により消化管が拡張したと考えられた。これに伴う摂食不良と胃腸障害が加わり瀕死に至ったと考えられた。死亡動物については体重が減少し、喘鳴、一部が黒色を呈する軟便、耳介の蒼白化、肛門周囲の汚染および消瘦がみられ、病理学検査で(胃、小腸、大腸は死後変化のため不明)胸腺、脾臓および子宮の萎縮が認められた。切迫屠殺動物と同様に体重の減少、喘鳴および胃腸管からの出血を示唆する一部が黒色を呈する軟便、貧血状態を示唆する耳介の蒼白化がみられていることから、切迫屠殺動物と同様な経過で死に至った可能性が考えられた。その他に、雄と同様、被験液の刺激性に関連したと考えられる喘鳴が700mg/kg投与群の3例にみられた。

体重では、700mg/kg投与群で投与8日以降に体重増加の抑制傾向がみられた。

摂餌量では、被験物質投与の影響は認められなかった。

病理学的検査では、雄と同様、700mg/kg投与群で肉眼的に胃の境界縁の肥厚、腺胃の暗赤色点散在と一部陥凹がみられ、組織学的に350mg/kg以上の投与群で境界縁粘膜の過

形成、噴門部粘膜の萎縮、さらに 700mg/kg 投与群で腺胃の糜爛と表層性出血がみられた。

親動物 (P) の生殖発生毒性に及ぼす影響に関して、700mg/kg 投与群においても雌の性周期および発情期像発現回数、雌雄の交尾までに要した日数、交尾率および受胎率に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。また、雄の精巣および精巣上体に組織学的な変化ならびに精細管のステージ分類に異常は認められず、精子の発生および発育に対する精巣毒性もないと考えられた。雌動物では、妊娠期間および分娩に異常は認められず、黄体数、着床痕数、着床率、新生児出産数、出生率および分娩率にも被験物質投与の影響は認められなかった。さらに、分娩後の哺育行動にも異常は認められなかった。したがって、700mg/kg の用量においても雌雄親動物の生殖能力に及ぼす影響はないと考えられた。

新生児 (F₁) に及ぼす影響に関して、700mg/kg 投与群においても新生児に外表異常は認められず、性比、死産児数、生存児数および出生率に被験物質投与の影響は認められなかった。しかし、700mg/kg 投与群の雌雄体重の低値傾向と生後 4 日における生存率の低値傾向が認められた。本変化は母体の妊娠および哺育期間中における毒性変化に起因する二次的な変化と推測された。

以上の如く、一般毒性学的な影響に関して、350mg/kg 以上の投与群の雌雄で胃の境界縁粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮、さらに 700mg/kg 投与群の雌雄で腺胃の糜爛と表層性出血、喘鳴、一部が黒色を呈する軟便、腹部膨満などがみられた。また、雄において体重増加の抑制、摂餌量の低値、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の低値、総蛋白質および α_1 -グロブリン分画比率の低値、雌においては死亡が 1 例、切迫屠殺が 1 例みられ、体重増加の抑制傾向が認められた。雌雄親動物の生殖能力に関しては、700mg/kg 投与群においても被験物質投与の影響は認められなかった。新生児の発生および生後の発育に関しては、700mg/kg 投与群の雌雄体重の低値傾向と生後 4 日における生存率の低値傾向が認められた。

したがって、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄ともに 175 mg/kg/day、親動物の生殖能力に関する無影響量は雌雄ともに 700mg/kg/day、新生児の発生および生後の発育に関する無影響量は 350mg/kg/day と推定された。

文 献

- 1) Marhold, J., Prague, 'Prehled Prumyslove Toxikologie ; Organicke Latky'
Czechoslovakia, Avicenum, 1055, 1986.
- 2) Madsen C : Squamous-cell carcinoma and oral, pharyngeal and nasal lesions
caused by foreign bodies in feed ; Cases from a long-term study in rats, Lab
Anim 23 : 1, 1989
- 3) Nakajima, K. and OHI, G. : Aerophagia Induced by the Nasal Obstruction on
Experimental Animals ; Exp. Anim., 26(2), 149-159, 1977

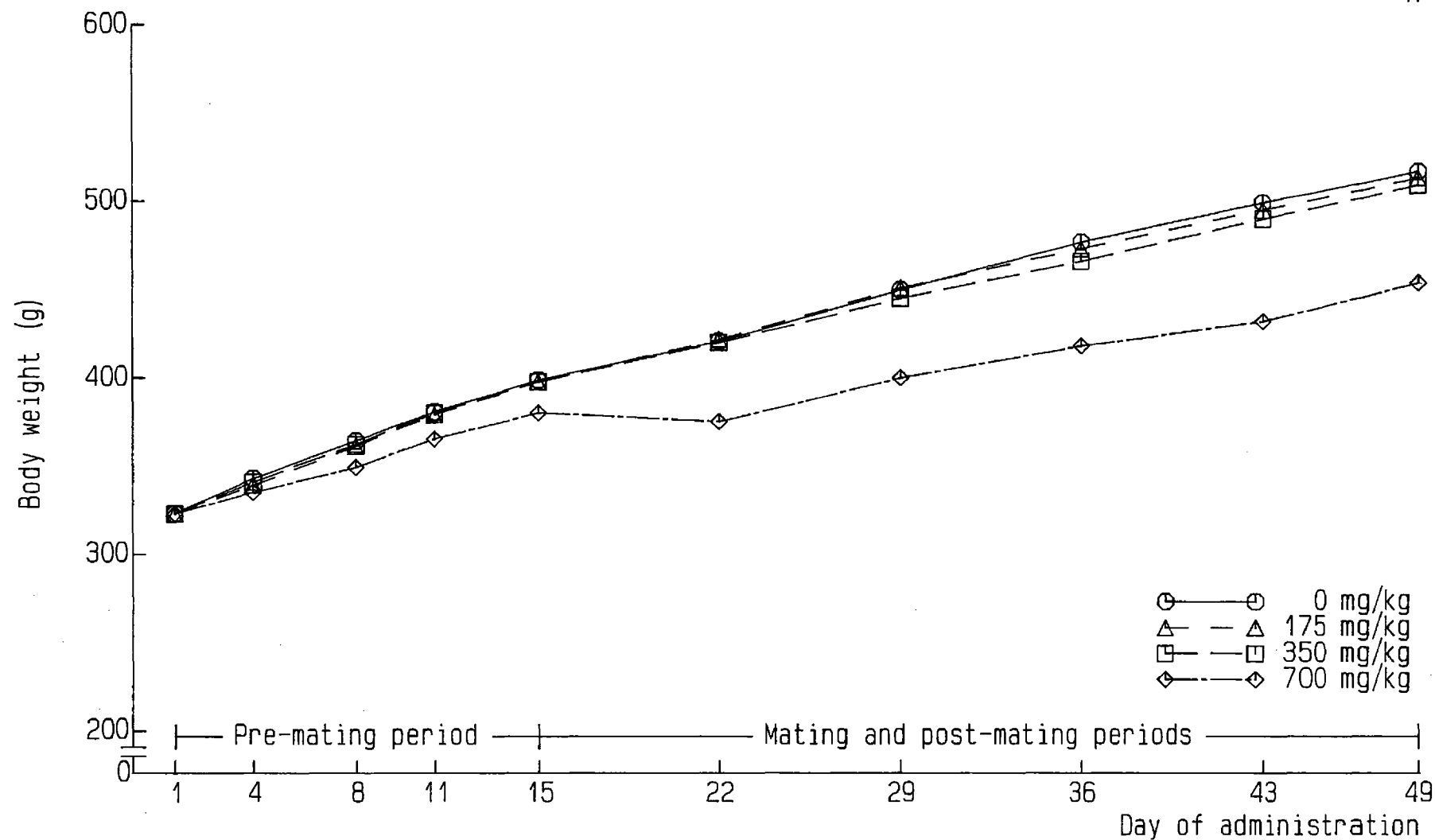


Figure 1 Body weight changes of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

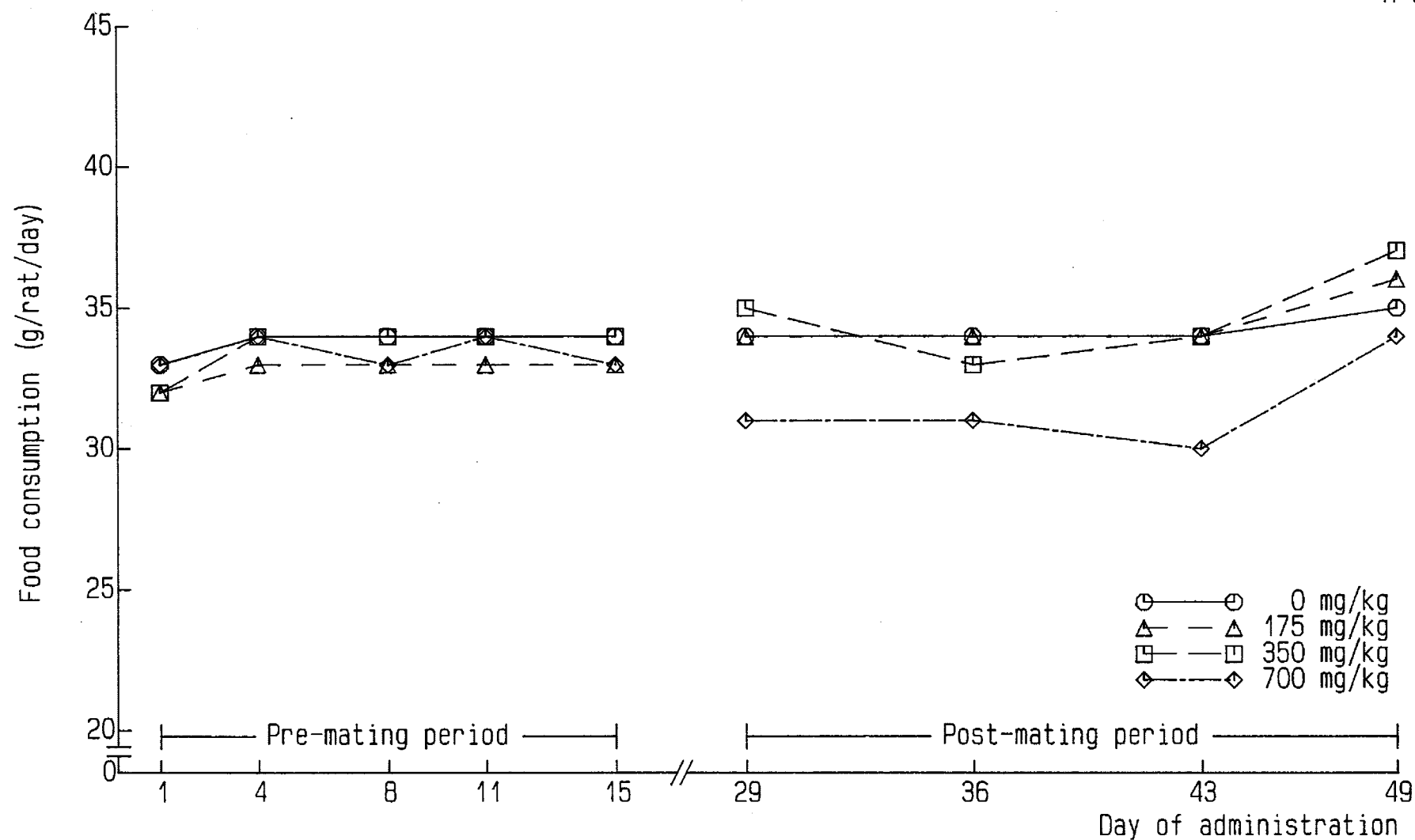


Figure 2 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

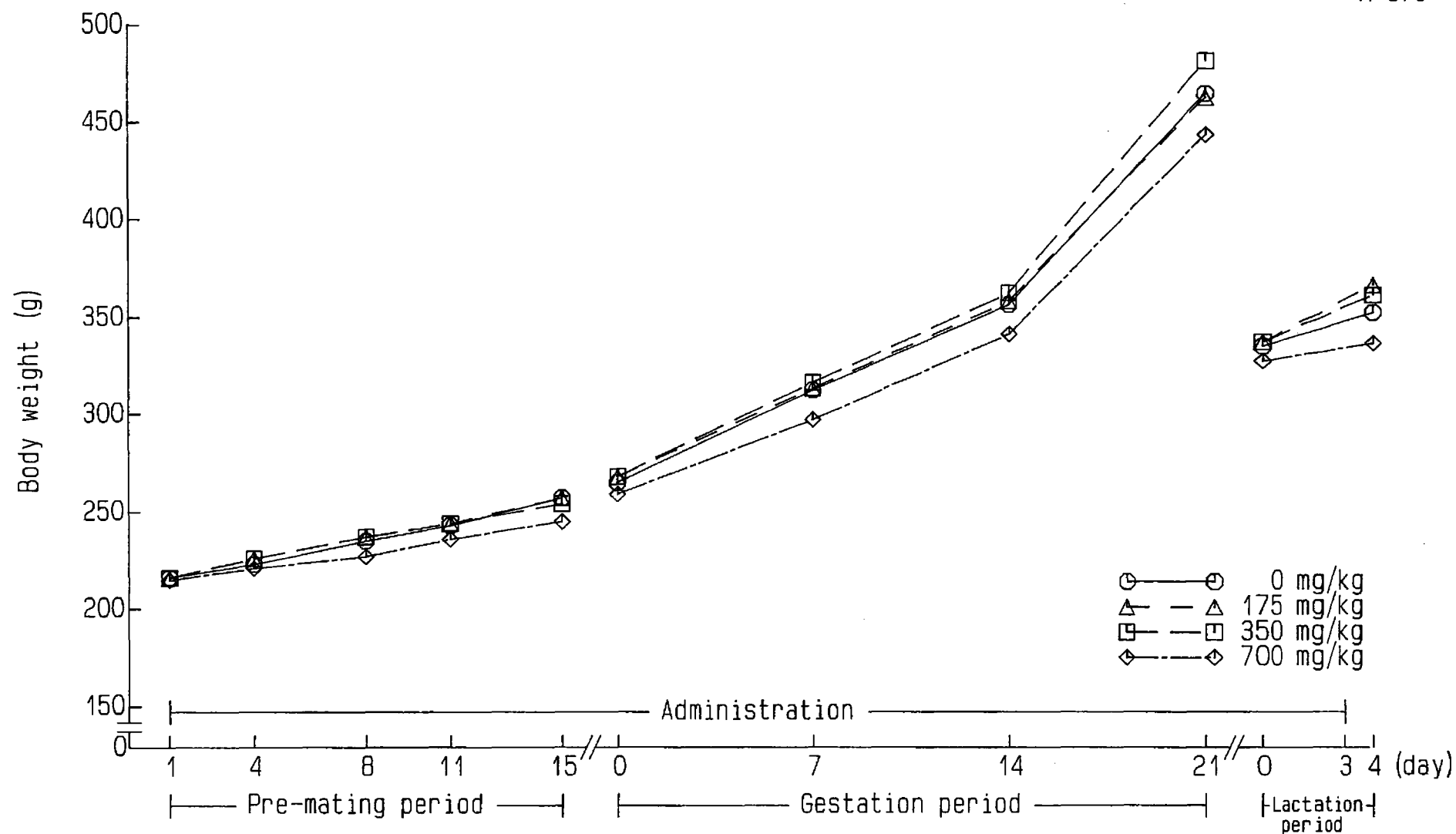


Figure 3 Body weight changes of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

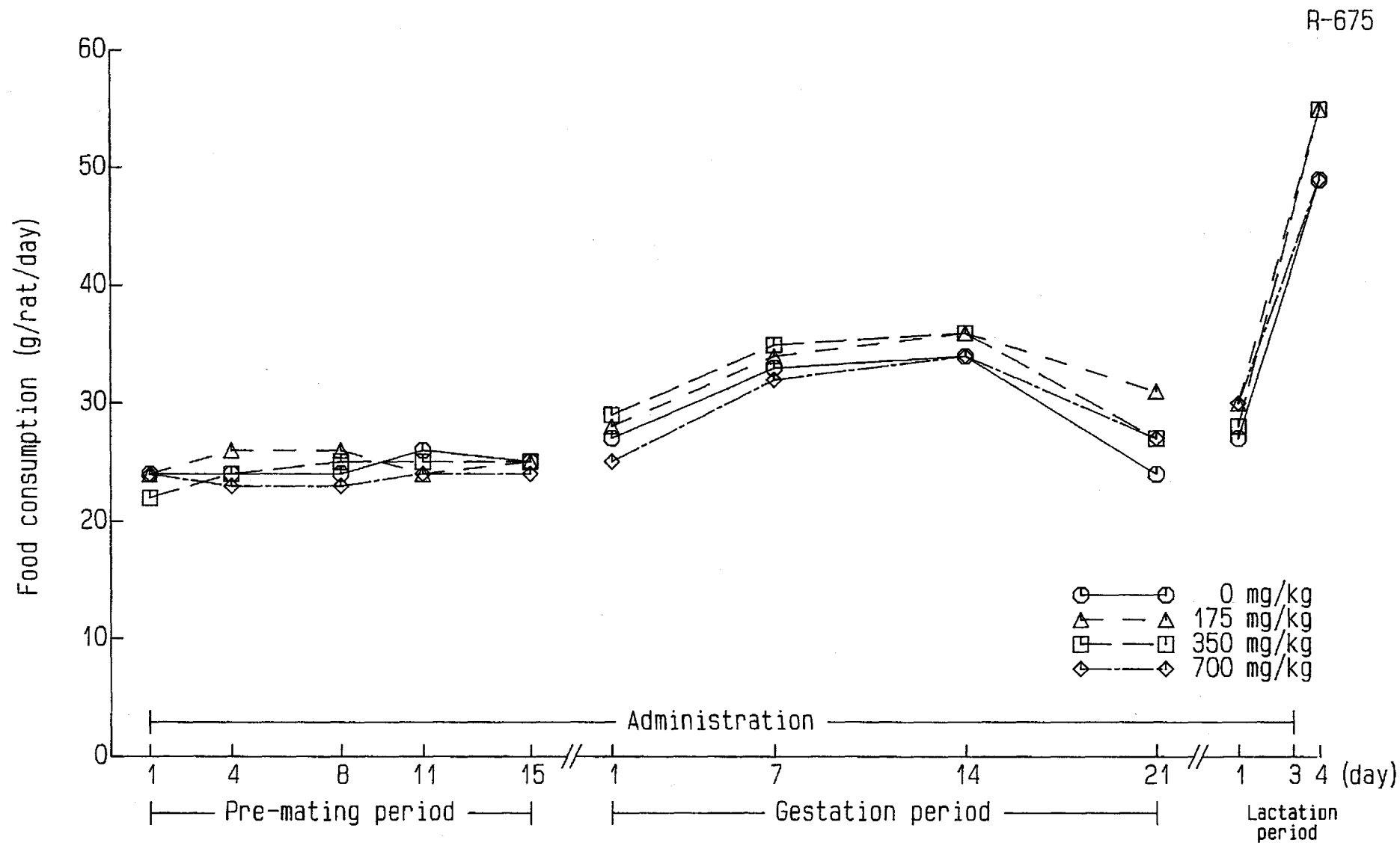


Figure 4 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Table 1 Clinical signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	Findings	Day of administration																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
175	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	4	4	3	1	1
	Wheezing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	4	4	4	3	1	1
	Soft feces (black change in part)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Abdominal distention	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Smudge of peri-anal area	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0

* : Commencement of pairing

Table 2 Clinical signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	Findings	Day of administration																											
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50a)	51a)		
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6		
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
175	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6		
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
350	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6		
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
700	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6		
	No. of animals with abnormal findings	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
	Wheezing	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
	Unkempt fur	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

a): Autopsy day

Table 3 Body weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration										Gain 1-49
		1	4	8	11	15	22	29	36	43	49	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	323	343	364	381	399	421	450	477	499	517	194
	S.D.	8	9	13	13	15	18	19	20	22	26	23
175	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	323	339	361	379	398	422	451	473	495	513	190
	S.D.	8	9	13	15	15	13	14	20	24	28	24
350	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	323	341	362	380	398	420	445	466	490	509	187
	S.D.	8	8	12	15	18	20	25	32	35	41	37
700	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	323	335	349	365	380*	375**	400**	418**	432**	454**	131**
	S.D.	8	12	21	19	19	47	50	55	50	48	45

Unit : g

No.: No. of animals

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 4 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration								
		1	4	8	11	15	29	36	43	49
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	33	34	34	34	34	34	34	34	35
	S.D.	2	3	3	3	2	3	3	2	3
175	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	32	33	33	33	33	34	34	34	36
	S.D.	7	3	4	3	2	2	3	3	3
350	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	32	34	34	34	34	35	33	34	37
	S.D.	2	1	2	3	3	3	2	3	3
700	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	33	34	33	34	33	31	31	30**	34
	S.D.	2	3	4	3	3	4	3	4	2

Unit : g/rat/day

No.: No. of animals

** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 5 Hematological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		RBC $\times 10^4/\text{mm}^3$	Hb g/dl	metHb %	Ht %	MCV μ^3	MCH pg	MCHC %	Reticu- locyte ‰	Plate- let $\times 10^4/\text{mm}^3$	PT sec.	APTT sec.	Fibri- nogen mg/dl
0	12	Mean	816	15.9	0.40	46	56.6	19.5	34.4	20	105.6	12.3	14.4	264
		S.D.	31	0.4	0.08	1	1.0	0.5	0.6	3	10.0	0.3	1.3	20
175	12	Mean	835	15.9	0.46	46	55.3	19.0	34.4	20	103.5	12.3	13.9	267
		S.D.	41	0.4	0.09	1	1.5	0.8	0.9	3	12.5	0.5	1.5	31
350	12	Mean	824	15.8	0.42	46	56.0	19.2	34.2	21	106.6	12.2	14.1	272
		S.D.	47	0.6	0.11	3	1.2	0.4	0.8	3	11.7	0.4	1.1	17
700	12	Mean	855	15.3	0.44	45	52.8**	17.9**	33.8	22	114.5	12.0	13.7	254
		S.D.	70	1.3	0.09	4	2.7	1.3	1.2	3	15.3	0.7	1.3	18

** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 6 Hematological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals	WBC		Differential leukocyte counts (%)						
			X10 ² /mm ³	Lymph.	Stab	Seg.	Eosino.	Baso.	Mono.	Others
0	12	Mean	112	88.4	0.0	10.8	0.7	0.0	0.1	0.0
		S.D.	26	3.0	0.1	3.0	0.5	0.0	0.2	0.0
175	12	Mean	117	86.6	0.0	12.9	0.4	0.0	0.1	0.0
		S.D.	23	4.5	0.0	4.2	0.4	0.0	0.2	0.0
350	12	Mean	108	86.1	0.0	12.8	1.0	0.0	0.1	0.0
		S.D.	22	5.2	0.0	5.2	0.7	0.0	0.2	0.0
700	12	Mean	124	84.4	0.0	14.9	0.5	0.0	0.2	0.0
		S.D.	38	8.9	0.0	9.2	0.7	0.0	0.2	0.0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 7

Myelogram examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Type of cells (%)	Dose (mg/kg) No. of animals	0 12	175 12	350 12	700 12
Erythrocytic cells					
Proerythroblast		0.0 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1
Basophilic		0.7 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.3
Polychromatic		26.0 $\pm$ 3.2	25.6 $\pm$ 3.3	26.2 $\pm$ 3.3	29.3 $\pm$ 4.7
Orthochromatic		6.3 $\pm$ 1.7	5.5 $\pm$ 1.0	5.9 $\pm$ 1.4	6.5 $\pm$ 1.8
Myelocytic cells					
Myeloblast		0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1
Promyelocyte		0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.2
Myelocyte		1.7 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.4
Metamyelocyte		7.9 $\pm$ 1.6	8.2 $\pm$ 1.7	8.0 $\pm$ 0.8	7.7 $\pm$ 1.3
Band form		20.3 $\pm$ 3.1	22.1 $\pm$ 1.7	22.8 $\pm$ 1.5	21.3 $\pm$ 2.6
Segmented form		1.1 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.5
Eosinophil		1.8 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.9	1.9 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.8
Basophil		0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1
Other cells					
Lymphocyte		31.9 $\pm$ 5.6	30.8 $\pm$ 3.9	29.6 $\pm$ 4.6	27.4 $\pm$ 6.5
Transitional cell		0.1 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.1
Monocyte		0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1
Megakaryocyte		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.1
Plasma cell		0.3 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.2
Mast cell		0.5 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.2
Reticulum cell		0.9 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.3
Mitotic phase		0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1
Others		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
M/E		1.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2

Mean $\pm$ S.D.

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8 Blood Chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		GOT IU/l	GPT IU/l	LDH IU/l	AlP IU/l	T.cho mg/dl	TG mg/dl	PL mg/dl	T.bili- rubin mg/dl	Glucose mg/dl
0	12	Mean	52	44	36	201	63	52	104	0.13	154
		S.D.	7	5	9	46	10	16	17	0.02	14
175	12	Mean	54	44	36	206	58	58	96	0.13	145
		S.D.	12	7	12	54	10	19	14	0.02	16
350	12	Mean	54	42	37	218	64	61	103	0.13	146
		S.D.	13	6	9	46	14	21	17	0.01	13
700	12	Mean	60	48	37	221	66	66	109	0.13	145
		S.D.	22	13	12	41	13	23	18	0.02	20

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 9

Blood Chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		BUN mg/dl	Crea- tinine mg/dl	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l	Ca mg/dl	P mg/dl	Fe μg/dl	TIBC μg/dl	UIBC μg/dl
0	12	Mean	16	0.62	143	4.1	109	9.5	7.5	104	504	400
		S.D.	1	0.04	1	0.3	2	0.3	0.6	43	37	54
175	12	Mean	16	0.62	144	4.3	109	9.5	7.7	102	500	398
		S.D.	3	0.03	1	0.2	2	0.3	0.7	40	44	62
350	12	Mean	16	0.65	143	4.2	109	9.3	7.8	107	501	394
		S.D.	2	0.05	1	0.3	2	0.2	0.6	52	32	56
700	12	Mean	15	0.60	144	4.2	109	9.4	8.2	159*	535	377
		S.D.	2	0.03	1	0.3	2	0.3	0.8	58	60	76

* : $p < 0.05$ (Significant difference from control group)

Table 10

Blood Chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		TP g/dl	A/G	Albumin %	Globulin (%)			
						α_1	α_2	β	γ
0	12	Mean	6.3	0.79	44.0	22.4	10.0	17.8	5.7
		S.D.	0.2	0.04	1.3	1.2	0.7	1.2	0.6
175	12	Mean	6.2	0.75	42.8	23.6	9.9	18.3	5.4
		S.D.	0.2	0.06	2.0	1.5	0.8	0.8	0.7
350	12	Mean	6.1	0.77	43.4	22.7	9.9	18.4	5.6
		S.D.	0.3	0.06	1.8	1.9	0.7	1.1	0.7
700	12	Mean	5.9**	0.79	44.1	20.5*	10.5	19.0	5.9
		S.D.	0.4	0.06	1.7	2.3	0.9	1.0	1.1

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 11 Gross pathological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	175	350	700
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of animals with abnormal findings (%)	2 (16.7)	0	1 (8.3)	10 (83.3)
Thymus				
Atrophy	0	0	0	1 (8.3)
Lung				
Focal brown change	0	0	0	1 (8.3)
Stomach				
Thickening of limiting ridge	0	0	1 (8.3)	9 (75.0)
Dark red spot in glandular stomach	0	0	0	1 (8.3)
Erosion in glandular stomach	0	0	0	1 (8.3)
Kidney				
Recessed area (unilateral)	1 (8.3)	0	0	0
Epididymis				
Nodule in cauda (unilateral)	1 (8.3)	0	0	0

Table 12

Absolute organ weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		Body weight	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney		
			g	mg	g	g	g	(R) g	(L) g	(R+L) g
0	12	Mean	486	350	1.44	14.08	0.77	1.65	1.69	3.34
		S.D.	24	65	0.15	1.19	0.09	0.13	0.14	0.24
175	12	Mean	481	326	1.45	14.01	0.77	1.69	1.72	3.41
		S.D.	22	57	0.12	1.35	0.09	0.13	0.15	0.27
350	12	Mean	480	345	1.38	13.77	0.73	1.60	1.61	3.22
		S.D.	38	78	0.12	1.95	0.17	0.13	0.15	0.28
700	12	Mean	424**	273	1.33	12.29*	0.71	1.58	1.58	3.16
		S.D.	54	90	0.13	2.17	0.16	0.16	0.14	0.29

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 13 Absolute organ weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		Testis			Epididymis		
			(R) g	(L) g	(R+L) g	(R) mg	(L) mg	(R+L) mg
0	12	Mean	1.67	1.69	3.36	629	634	1263
		S.D.	0.11	0.11	0.22	46	89	133
175	12	Mean	1.69	1.66	3.35	631	617	1248
		S.D.	0.11	0.11	0.21	42	46	87
350	12	Mean	1.68	1.66	3.34	618	611	1229
		S.D.	0.11	0.10	0.20	48	29	73
700	12	Mean	1.64	1.64	3.28	625	592	1217
		S.D.	0.09	0.10	0.19	64	66	125

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 14 Relative organ weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney		
			mg%	g%	g%	g%	(R) g%	(L) g%	(R+L) g%
0	12	Mean	72	0.30	2.90	0.16	0.34	0.35	0.69
		S.D.	13	0.03	0.17	0.02	0.02	0.03	0.05
175	12	Mean	68	0.30	2.91	0.16	0.35	0.36	0.71
		S.D.	12	0.03	0.17	0.02	0.03	0.03	0.05
350	12	Mean	73	0.29	2.86	0.15	0.34	0.34	0.67
		S.D.	19	0.03	0.25	0.03	0.03	0.02	0.06
700	12	Mean	63	0.32	2.89	0.16	0.38**	0.38	0.75*
		S.D.	16	0.03	0.19	0.02	0.03	0.03	0.06

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 15

Relative organ weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals		Testis			Epididymis		
			(R) g%	(L) g%	(R+L) g%	(R) mg%	(L) mg%	(R+L) mg%
0	12	Mean	0.34	0.35	0.69	130	131	261
		S.D.	0.03	0.03	0.06	12	20	31
175	12	Mean	0.35	0.35	0.70	132	129	260
		S.D.	0.03	0.03	0.05	10	12	22
350	12	Mean	0.35	0.35	0.70	129	128	257
		S.D.	0.03	0.04	0.07	11	11	22
700	12	Mean	0.39**	0.39**	0.78**	149**	140	289*
		S.D.	0.04	0.04	0.08	15	10	23

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 16

Histopathological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Organs -findings	Dose (mg/kg)	0										175										350										700									
		12										12										12										12									
		No. of animals	Grade	0	1	2	3	4	P	Obs	TE	0	1	2	3	4	P	Obs	TE	0	1	2	3	4	P	Obs	TE	0	1	2	3	4	P	Obs	TE						
Stomach																																									
-hyperplasia, mucosa, limiting ridge		12							12	12							12	3	8	1		9	12**	1	6	5				11	12**										
-atrophy, mucosa, cardiac region		12							12	12							12	3	6	3		9	12**		3	9				12	12**										
-erosion (including healed erosion), glandular stomach		12							12	12							12	12				12		6	1	3	2			6	12*										
-hemorrhage, superficial, glandular stomach		12							12	12							12	12				12		7	3	2			5	12											

0 : No remarkable changes 1 : Slight 2 : Mild 3 : Moderate 4 : Severe
 P : Present (used when grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion)
 Obs : Observed number
 TE : Total Examined

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 17

Histopathological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Organs -findings	Dose (mg/kg)	0									700								
	No. of animals Grade																		
		0	1	2	3	12 4	P	Obs	TE	0	1	2	3	12 4	P	Obs	TE		
Cerebrum		12							12	12							12		
Cerebellum		12							12	12							12		
Heart																			
-myocardial degeneration/fibrosis		12							12	10	2					2	12		
Liver																			
-microgranuloma		7	5					5	12	9	2	1				3	12		
Adrenal		12							12	12							12		
Spleen																			
-hematopoiesis, extramedullary			11	1				12	12		11	1				12	12		
-deposit, brown pigment, red pulp			12					12	12		12					12	12		
Kidney																			
-fibrosis, cortical, focal		11			1			1	12	12							12		
-basophilic tubule		10	1	1				2	12	12							12		
-eosinophilic body, tubular epithelium		11		1				1	12	12							12		
Testis		12							12	12							12		
Epididymis																			
-granuloma, spermatic		11		1				1	12	12							12		

0 : No remarkable changes 1 : Slight 2 : Mild 3 : Moderate 4 : Severe

P : Present (used when grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion)

Obs : Observed number

TE : Total Examined

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 18

Histopathological findings in gross lesion of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	Animal number	Organs	Gross pathological findings	Histopathological findings
700	4011	Lung	-focal brown change	-granuloma, foreign body/giant cell (+)
	4012	Thymus	-atrophy	-atrophy (+)

+ : Mild

Table 19

Staging of seminiferous tubules of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg		Stage (%)			
		I ~ VI	VII ~ VIII	IX ~ XI	XII ~ XIV
0	No.	12	12	12	12
	Mean	47.0	26.8	8.4	17.8
	S.D.	2.3	5.0	1.8	4.4
700	No.	12	12	12	12
	Mean	46.3	28.5	7.0	18.3
	S.D.	3.3	3.3	1.8	3.3

No significant difference in treated group from control group.

Table 20

Clinical signs of female rats during the pre-mating and mating periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	Findings	Day of administration																										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	8	1	1	1	0							
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
175	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	4	3	0									
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0										
350	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	5	3	1	0								
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
700	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	5	5	3	2	2	2	1	1	1	1	1	1
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Wheezing	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	Soft feces (black change in part)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
	Smudge of peri-anal area	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
	Emaciation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	Paleness of pinna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

* : Commencement of pairing

Table 21

Clinical signs of dams during the gestation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

[illegible]

Table 22 Clinical signs of dams during the lactation period in combined repeat dose and reproductive/
developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	Findings	Day of lactation				
		0	1	2	3	4
0	No. of dams	10	10	10	10	10
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
175	No. of dams	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
350	No. of dams	11	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0
700	No. of dams	9	9	9	9	9
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	1	1
	Wheezing	0	0	0	1	1
	Nipple immaturity	0	0	0	1	1

Table 23 Body weights of female rats during the pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration					Gain 1-15
		1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	216	223	235	243	257	41
	S.D.	9	14	15	17	19	13
175	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	216	226	237	244	257	41
	S.D.	8	11	12	11	12	8
350	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	216	226	237	244	254	38
	S.D.	9	10	11	12	11	8
700	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	215	221	227	236	245	30*
	S.D.	9	10	16	12	12	11

Unit : g

No.: No. of animals

* : $p < 0.05$ (Significant difference from control group)

Table 24

Body weights of dams during the gestation and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg		Day of gestation				Gain 0-21	Day of lactation		Gain 0-4
		0	7	14	21		0	4	
0	No.	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mean	265	312	356	464	199	335	352	17
	S.D.	24	26	27	35	23	34	35	11
175	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	268	313	358	462	194	337	366	29
	S.D.	14	17	20	26	18	29	24	17
350	No.	11	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	268	316	362	481	213	337	361	24
	S.D.	14	14	12	15	12	18	21	22
700	No.	10 ^{a)}	9 ^{b)}	9	9	9	9	9	9
	Mean	259	297	341	443	183	327	336	10
	S.D.	15	28	28	38	27	29	40	22

Unit : g

No.: No. of dams

a) : One female died on day 27 of administration.

b) : One dam was sacrificed on day 5 of gestation because of moribund.

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 25 Food consumption of female rats during the pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg		Day of administration				
		1	4	8	11	15
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	24	24	24	26	25
	S.D.	3	2	3	4	3
175	No.	12	12	12	12	12
	Mean	24	26	26	24	25
	S.D.	2	4	4	3	3
350	No.	12	12	12	12	12
	Mean	22	24	25	25	25
	S.D.	3	2	3	4	3
700	No.	12	12	12	12	12
	Mean	24	23	23	24	24
	S.D.	3	3	8	4	4

Unit : g/rat/day

No.: No. of animals

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 26

Food consumption of dams during the gestation and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg		Day of gestation				Day of lactation	
		1	7	14	21	1	4
0	No.	10	10	10	10	10	10
	Mean	27	33	34	24	27	49
	S.D.	3	3	4	7	10	10
175	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	28	34	36	31**	30	55
	S.D.	6	3	3	4	6	6
350	No.	11	11	11	11	11	11
	Mean	29	35	36	27	28	55
	S.D.	3	2	3	4	8	9
700	No.	10 ^{a)}	9 ^{b)}	9	9	9	9
	Mean	25	32	34	27	30	49
	S.D.	8	5	4	5	7	14

Unit : g/rat/day

No.: No. of dams

a) : One female died on day 27 of administration.

b) : One dam was sacrificed on day 5 of gestation because of moribund.

** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 27 Gross pathological findings of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	175	350	700
No. of dams examined	10	12	11	9
No. of dams with abnormal findings (%)	0	1 (8.3)	1 (9.1)	4 (44.4)
Lung				
Dark red spot	0	1 (8.3)	0	1 (11.1)
Stomach				
White spot in glandular stomach	0	0	1 (9.1)	0
Recessed area in glandular stomach	0	0	0	1 (11.1)
Thickening of limiting ridge	0	0	0	2 (22.2)
Disseminated red spots in glandular stomach	0	0	0	1 (11.1)
Nipple and mammary gland				
Immaturity	0	0	0	1 (11.1)

Table 28

Absolute organ weights of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of dams		Body weight	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney			Ovary		
			g	mg	g	g	g	(R) g	(L) g	(R+L) g	(R) mg	(L) mg	(R+L) mg
0	10	Mean	352	224	1.03	14.47	0.65	1.17	1.17	2.34	57.0	53.0	110.0
		S.D.	35	77	0.07	1.78	0.12	0.08	0.09	0.16	9.5	8.6	12.2
175	12	Mean	366	244	1.08	15.89	0.70	1.22	1.22	2.44	58.7	56.9	115.7
		S.D.	24	48	0.07	1.26	0.12	0.06	0.07	0.12	4.6	10.9	13.0
350	11	Mean	361	237	1.06	15.81	0.71	1.26	1.27	2.52	56.6	59.4	116.0
		S.D.	21	75	0.07	0.93	0.09	0.12	0.11	0.21	6.7	9.4	12.7
700	9	Mean	336	218	1.04	14.81	0.64	1.24	1.23	2.47	56.2	57.1	113.3
		S.D.	40	67	0.11	2.37	0.11	0.14	0.15	0.28	12.1	12.4	15.7

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 29 Relative organ weights of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of dams		Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney			Ovary		
			mg%	g%	g%	g%	(R) g%	(L) g%	(R+L) g%	(R) mg%	(L) mg%	(R+L) mg%
0	10	Mean	64	0.29	4.11	0.18	0.33	0.34	0.67	16.4	15.1	31.5
		S.D.	21	0.03	0.20	0.02	0.04	0.03	0.07	3.2	2.4	4.3
175	12	Mean	67	0.30	4.35	0.19	0.33	0.34	0.67	16.1	15.6	31.7
		S.D.	12	0.01	0.30	0.03	0.02	0.02	0.04	1.8	2.9	3.9
350	11	Mean	66	0.29	4.38	0.20	0.35	0.35	0.70	15.7	16.5	32.1
		S.D.	20	0.01	0.22	0.03	0.03	0.02	0.04	1.5	2.4	2.9
700	9	Mean	64	0.31*	4.39	0.19	0.37*	0.37	0.74*	17.3	17.3	34.6
		S.D.	15	0.01	0.44	0.02	0.04	0.03	0.06	6.0	4.7	9.2

* : $p < 0.05$ (Significant difference from control group)

Table 30

Histopathological findings of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose (mg/kg) : 700

Dead/moribund animals

Organs -findings	Animal number	
	4110	4112a)
Cerebrum	0	0
Cerebellum	0	0
Heart	0	0
Lung		
-inflammatory cell infiltration, peribronchiolar	2	/
Stomach		
-necrosis, mucosa, glandular stomach	A	4
-hemorrhage, submucosa, glandular stomach	A	2
-edema, submucosa, glandular stomach	A	3
-inflammatory cell infiltration, glandular stomach	A	3
-erosion, limiting ridge	A	1
Duodenum		
-atrophy, mucosa	/	1
Jejunum		
-atrophy, mucosa	/	1
Ileum		
-atrophy, mucosa	/	1
Cecum	/	0
Colon	/	0
Rectum	/	0

0 : No remarkable changes 1 : Slight 2 : Mild 3 : Moderate 4 : Severe

A : Autolysis

/ : Not examined due to no macropathological findings

a): Sacrificed moribund on day 5 of gestation.

Table 31 Histopathological findings of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose (mg/kg) : 700

Dead/moribund animals

Organs -findings	Animal number	
	4110	4112a)
Liver	0	0
Adrenal	0	0
Thymus		
-atrophy	4	/
Spleen		
-atrophy	3	3
-deposit, brown pigment, red pulp	1	1
Kidney	0	0
Ovary	0	0
Uterus		
-atrophy	2	/

0 : No remarkable changes 1 : Slight 2 : Mild 3 : Moderate 4 : Severe

/ : Not examined due to no macropathological findings

a): Sacrificed moribund on day 5 of gestation.

Table 32

Histopathological findings of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Organs -findings	Dose (mg/kg)	0								175								350								700										
		12								12								12								10										
		No. of animals	Grade	0	1	2	3	4	P	Obs	TE	0	1	2	3	4	P	Obs	TE	0	1	2	3	4	P	Obs	TE	0	1	2	3	4	P	Obs	TE	
Stomach																																				
-hyperplasia, mucosa, limiting ridge		12								12	12							12	8	2	1			3	11(1)	3	1	6				7	10**			
-atrophy, mucosa, cardiac region		12								12	12							12	8	3				3	11(1)		2	8				10	10**			
-erosion (including healed erosion), glandular stomach		12								12	12							12	11						11(1)	5	2	3				5	10			
-hemorrhage, superficial, glandular stomach		12								12	12							12	11						11(1)	9	1				1	10				
-hyperplasia, mucosa, forestomach, focal		12								12	12							12	10	1				1	11(1)	10								10		

0 : No remarkable changes 1 : Slight 2 : Mild 3 : Moderate 4 : Severe
P : Present (used when grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion)
Obs : Observed number
TE : Total Examined
() : Number of lost specimens

** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

Table 33

Histopathological findings of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Organs -findings	Dose (mg/kg)	0									700								
	No. of animals Grade	12									10								
		0	1	2	3	4	P	Obs	TE	0	1	2	3	4	P	Obs	TE		
Cerebrum		12							12		10						10		
Cerebellum		12							12		10						10		
Heart																			
-myocardial degeneration/fibrosis		11		1				1	12		9		1			1	10		
Liver																			
-microgranuloma		11	1					1	12		9	1				1	10		
-hematopoiesis, extramedullary		10	2					2	12		8	2				2	10		
Adrenal		12							12		10						10		
Spleen																			
-hematopoiesis, extramedullary			6	6				12	12			3	7			10	10		
-deposit, brown pigment, red pulp			9	3				12	12			9	1			10	10		
Kidney		12							12		10						10		
Ovary		12							12		10						10		

0 : No remarkable changes 1 : Slight 2 : Mild 3 : Moderate 4 : Severe

P : Present (used when grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion)

Obs : Observed number

TE : Total Examined

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 34

Histopathological findings in gross lesion of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	Animal number	Organs	Gross pathological findings	Histopathological findings
175	2111	Lung	-dark red spot	-hemorrhage, focal (+-)
700	4102	Mammary gland	-immaturity	-undevelopment, lactating gland (+)
	4103	Lung	-dark red spot	-inflammatory cell infiltration, focal (+-) -hemorrhage, focal (+-)

+ - : Slight + : Mild

Table 35 Estrous cycle in female rats during the pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus					Mean±S.D.	Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4		
0	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5	4.2±0.5
175	12	0	0	1	5	6	3.4±0.7	4.8±2.0
350	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5	4.3±0.4
700	12	0	0	0	6	6	3.5±0.5	4.3±0.4

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 36

Reproductive performance of male and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid

Dose mg/kg	Male				Female			
	No. of males	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) b)	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) b)
0	12	2.8±1.3	12/12(100.0)	10/12(83.3)	12	2.8±1.3	12/12(100.0)	10/12(83.3)
175	12	2.3±1.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.3±1.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)
350	12	2.5±1.3	12/12(100.0)	11/12(91.7)	12	2.5±1.3	12/12(100.0)	11/12(91.7)
700	12	2.6±2.2	12/12(100.0)	11/12(91.7)	11	2.7±2.3	11/11(100.0)	10/11(90.9)

a): (No. of pairs with successful copulation / No. of pairs mated) × 100

b): (No. of pregnant animals / No. of pairs with successful copulation) × 100

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 37

Findings of delivery on dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females a)	Gestation index % b)	Gestation length	No. of corpora lutea	No. of implan- tation sites	Implan- tation index % c)	No. of still born	No. of live born	Live birth index % d)	Delivery index % e)
0	Total	10	10	100.0		185	180		1	155		
	Mean				22.7	18.5	18.0	97.1	0.1	15.5	99.6	85.5
	S.D.				0.5	2.4	2.7	3.1	0.3	4.7	1.4	21.5
175	Total	12	12	100.0		226	212		1	187		
	Mean				22.7	18.8	17.7	94.1	0.1	15.6	99.5	88.8
	S.D.				0.5	1.6	1.7	8.3	0.3	2.0	1.8	8.9
350	Total	11	11	100.0		214	206		1	193		
	Mean				22.5	19.5	18.7	96.3	0.1	17.5	99.5	94.5
	S.D.				0.5	2.0	1.8	3.7	0.3	1.6	1.7	6.5
700	Total	9	9	100.0		163	161		0	147		
	Mean				22.3	18.1	17.9	98.8	0.0	16.3	100.0	91.5
	S.D.				0.5	2.7	2.8	2.5	0.0	2.6	0.0	6.4

a): No. of females with live pups

b): (No. of females with live pups / No. of pregnant females) × 100

c): (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) × 100

d): (No. of live pups on day 0 / No. of pups born) × 100

e): (No. of pups born / No. of implantation sites) × 100

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 38

Findings of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg	No. of dams		No. of males	No. of females	Sex ratio a)	External b) malfor- mations (%)c)	Day 0	Day 4	Viability index % d)
							No. of live pups	No. of live pups	
0	10	Total	78	77		0	155	153	
		Mean	7.8	7.7	0.53	(0.0)	15.5	15.3	99.0
		S.D.	3.0	4.0	0.18	(0.0)	4.7	4.5	2.1
175	12	Total	91	96		0	187	184	
		Mean	7.6	8.0	0.49	(0.0)	15.6	15.3	98.2
		S.D.	2.7	2.7	0.17	(0.0)	2.0	2.3	4.4
350	11	Total	94	99		0	193	187	
		Mean	8.5	9.0	0.49	(0.0)	17.5	17.0	97.0
		S.D.	1.3	1.5	0.07	(0.0)	1.6	1.5	4.5
700	9	Total	69	78		0	147	128	
		Mean	7.7	8.7	0.47	(0.0)	16.3	14.2	85.9
		S.D.	1.9	2.6	0.11	(0.0)	2.6	5.6	28.2

a): No. of males / No. of live born pups

b): No. of live born pups with external malformations

c): (No. of live born pups with external malformations / No. of live born pups) × 100

d): (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0) × 100

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 39 Body weights of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose mg/kg		Male		Female	
		0	4	0	4a)
0	No.	10	10	10	10
	Mean	7.2	11.3	6.9	10.8
	S.D.	0.8	2.7	0.7	2.2
175	No.	12	12	12	12
	Mean	7.2	11.1	6.8	10.5
	S.D.	0.7	1.2	0.6	0.8
350	No.	11	11	11	11
	Mean	7.0	10.7	6.7	10.1
	S.D.	0.5	0.8	0.5	0.7
700	No.	9	9	9	9
	Mean	6.7	10.0	6.3	9.5
	S.D.	0.3	2.3	0.4	2.2

Unit : g

No.: No. of dams

a) : Day after birth

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 40 Gross pathological findings of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	175	350	700
Male				
No. of pups examined	78	90	90	59
No. of pups with abnormal findings (%)	0	0	1 (1.1)	1 (1.7)
Undernourishment	0	0	0	1 (1.7)
No milk curd in stomach	0	0	0	1 (1.7)
Umbilical hernia	0	0	1 (1.1)	0
Female				
No. of pups examined	75	94	97	69
No. of pups with abnormal findings (%)	0	0	1 (1.0)	2 (2.9)
Undernourishment	0	0	1 (1.0)	1 (1.4)
No milk curd in stomach	0	0	1 (1.0)	2 (2.9)