

最終報告書訂正版

m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムのラットを用いる 経口投与簡易生殖毒性試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

試験施設

財団法人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

目次

要約	5
試験目的	5
材料と方法	6
1. 被験物質	6
2. 動物および飼育方法	7
3. 投与検体	7
4. 投与量の設定および投与方法	8
5. 検査法	9
1) 親動物 (F_0)	9
2) 出生児 (F_1)	10
6. データの解析法	11
試験成績	11
1. 親動物	11
1) 一般状態	11
2) 体重	11
3) 摂餌量	11
4) 器官重量	12
5) 剖検所見	12
6) 病理組織学的検査	12
2. 生殖能力	12
1) 性周期および交配成績	12
2) 出産率および妊娠期間	12
3) 分娩および哺育状態	13
4) 黄体数、着床数および着床率	13
3. 出生児	13
1) 生存	13
2) 体重	13
3) 出生児観察	13
考察	13
参考文献	14
Tables	19

要約

今回、*m*-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの雌雄動物の生殖能力に対する影響および新生児の発育に及ぼす影響を検討することを目的として、簡易生殖毒性試験を OECD 化学物質試験法ガイドラインに従って実施した。*m*-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを 0 (媒体: 日局注射用水)、100、300 ならびに 1000 mg/kg の用量で雌雄の CrI:CD (SD) ラットに経口投与し、雄は 42 日間投与した後に剖検した。雌は交配前 2 週間および交配期間、妊娠期間を通して哺育 3 日まで連日投与した。なお、母動物は自然分娩させ、出生児とともに哺育 4 日に剖検した。

1. 親動物所見

雌雄動物とも、死亡動物は観察されなかった。一般状態、体重推移、摂餌量、器官重量、剖検所見および病理組織所見に被験物質投与による影響は認められなかった。

2. 出生児所見

出生児所見、出生児の生存性および体重には、被験物質投与の影響は認められなかった。

3. 生殖発生毒性学的所見

性周期、交配成績、出産率および妊娠期間、黄体数、着床数および着床率、分娩および哺育状態には、被験物質投与による影響はみられなかった。

4. 無毒性量

以上の結果から、本試験条件下における *m*-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの親動物に対する一般毒性学的無毒性量は 1000 mg/kg/day で、生殖発生毒性学的な無毒性量ならびに次世代に対する無毒性量も 1000 mg/kg/day であると判断される。

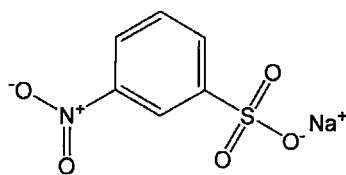
試験目的

雌雄ラットの交配前(2 週間)および交配期間中(最長 2 週間)、ならびに雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間を通して周産期(哺育 3 日まで)に、*m*-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを経口投与し、雌雄ラットに対する生殖毒性について検討した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である *m*-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(別名:3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム、Sodium 3-nitrobenzenesulphonate、CAS No.:127-68-4、分子式: $\text{C}_6\text{H}_4\text{NNaO}_5\text{S}$ 、分子量:225.15、外観:白色、粉末、純度:97.0%、融点:350℃、ロット番号:005W2116、Annex A、以下、NSB)は関東化学より購入し(被験物質入手:2010年6月11日、)、使用時まで冷蔵・遮光下(実測値3~7℃)で保管した。NBSの構造式を次に示す。



被験物質の安定性は、投与開始前(2010年9月24日)および投与期間終了後(2010年12月10日)に秦野研究所にてフーリエ変換赤外分光光度計(FTIR-8300、島津製作所)を使用し、臭化カリウム錠剤法にて赤外吸収スペクトル(測定範囲:4000~400 cm^{-1})を測定して調べ、2つのスペクトルに変化がないことを確認した(Annex B)。

2. 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より、8 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系ラット〔CrI:CD(SD)、SPF〕雄 62 匹、雌 73 匹購入し、8 号室に収容した。入荷日も含めて 14 日間、検疫と飼育環境への馴化のため飼育した。その間毎日、動物の一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。検疫・馴化期間中は動物の尾にフェルトペンで馴化番号を記し、飼育ケージに試験番号、性別および馴化番号を記入した動物カードを掛けて識別した。また、雌動物については、入荷翌日から毎日、性周期を観察した。入荷時および検疫終了時の体重は以下の通りであった。

動物入荷日:	2010 年 9 月 22 日
入荷時体重:	雄 260.1～285.5 g、雌 167.9～202.3 g
検疫終了日:	2010 年 10 月 5 日
検疫終了時体重:	雄 328.5～421.8 g、雌 197.6～269.8 g

検疫期間中の一般状態および体重推移に異常は認められなかった。雌動物で規則的な性周期の回帰が認められない 2 匹を除外し、体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。群分けした動物には一連の動物番号を割り当て、フェルトペンで尾に動物番号を標識し、色彩の異なった動物カードに試験番号、性別および動物番号を記入して飼育ケージに掛けた。群分けから棄却された雄動物 10 匹、雌動物 19 匹および性周期の結果により除外した 2 匹は全て余剰動物とした。雄動物 2 匹は他試験に使用し、残りの雄動物 8 匹および雌動物 21 匹は炭酸ガス吸入法により安楽死させた。

動物は、許容温度 21.0～25.0℃、許容湿度 40.0～75.0%、換気設定約 15 回/時間、明暗サイクル 12 時間(7 時～19 時)点灯、12 時間(19 時～7 時)消灯に設定された飼育室内で、金属製金網床ケージ(220w×270d×190h mm)に 1 匹ずつ(交配時は 2 匹)収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。雌動物は全例について、妊娠 18 日から哺育 4 日までラット用プラスチック製繁殖ケージ(350w×400d×180h mm)に 1 匹ずつ収容し、床敷として紙パルプ製チップ(ペパーグリーン、日本エスエルシー)を適宜供給した。

飼育期間中に飼育環境の異常は認められず、飼育室の温度は 22.0～24.0℃、湿度は 42.5～68.5%であり、いずれも許容範囲内であった。また、供給した飼料、水および床敷の分析結果は、いずれも標準操作手順書に記載の許容範囲内であることを確認した。

3. 投与検体

1) 調製

NBS を秤量し、媒体である日局注射用水(光製薬株式会社、製造番号:A99HA1)で溶解させ、20 w/v%溶液を調製した。さらに 20 w/v%溶液を媒体で希釈し、6 ならびに 2 w/v%溶液を段階的に調製した。調製した検体は冷蔵・遮光下(実測値 2～7℃)で保管し、調製後 8 日以内に使用した。

2) 安定性試験

投与に先立ち、2 および 20 w/v%濃度の投与検体について、冷蔵、遮光条件下(実測値 3～4℃)における 4 および 8 日間の安定性を確認した(Annex C)。なお、本被験物質を用いた「3-ニトロベンゼンスル

ホン酸ナトリウムのラットを用いる 28 日反復経口投与毒性試験¹⁾で、0.2 および 20% (w/v) 溶液 (溶媒: 日局注射用水、被験物質の購入元: 小西化学工業株式会社) は、冷暗所で 10 日間安定であることが確認されている。

3) 含量測定

本試験の初回調製検体 (調製日 2010 年 10 月 5 日) について、2、6 および 20 w/v% 濃度の調製検体の含量を測定した。含量の判断基準は、平均含量が調製濃度の 90.0～110 %、また各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0～110 % 以内とした。その結果、平均含量はそれぞれの調製濃度の 101.4～102.0% であり、各測定値のばらつきは 99.1～101.0% で規定範囲内にあった (Annex D)。

調製検体中の NBS 濃度は以下の方法で測定した。調製検体の 0.5 mL を採取し、蒸留水で希釈して試料溶液を調製した (50.0 µg/mL 付近)。別に被験物質 10 mg を精密に量り、水に溶解して適宜希釈し、約 25、50 および 100 µg/mL の標準溶液を調製した。試料溶液および標準溶液を、以下に示す高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により測定し、標準溶液から作成した検量線を用いて調製検体中の NBS 濃度を算出した。

HPLC 条件

分析カラム	Puresil TM C18 (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 µm、ウォーターズ)
移動相	0.1% リン酸/メタノール混液 (7:3 v/v)
流量	1 mL/min
カラム設定温度	40℃
試料設定温度	室温
測定波長	254 nm
試料注入量	10 µL
オートインジェクタ洗浄液	蒸留水

4. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は既報の「3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験」¹⁾の結果をもとに設定した。すなわち、100、300 および 1000 mg/kg の 3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを雌雄各 5 匹の SD 系ラット (溶媒対照群および 1000 mg/kg 投与群では雌雄各 5 匹の 14 日間の回復群を設けている) に 28 日間、反復経口投与した結果、雌雄とも 1000 mg/kg 投与により、投与直後に一過性の流涎がみられた。しかし、28 日間の反復投与により死亡動物は観察されず、一般状態、体重、摂餌量、尿検査、剖検および病理組織学的検査においても 3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム投与に関連した変化は認められていない。したがって、本試験における高用量群の投与量を 1000 mg/kg に設定し、以下、公比が約 3 になるように中用量を 300 mg/kg、低用量を 100 mg/kg とした。

雌動物は交配前 2 週間、交配期間、妊娠期間を通して分娩後の哺育 3 日まで、交尾が確認されなかった雌は剖検前日まで (総投与回数 42 回)、交尾は確認されたが分娩が認められない雌は剖検前日

(妊娠 25 日相当日)まで、雄動物は交配前 2 週間、交配期間(14 日間)を通して剖検前日まで(総投与回数 42 回)、経口的に 1 日 1 回、1 週 7 回、午前中(9 時～11 時 34 分)に投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、雄および交配前ならびに交配中の雌、さらに交尾が確認されなかった雌では週 1 回測定する体重を基に、交尾が確認された雌では、最新の測定日の体重を基に算出した。なお、対照群には媒体である日局注射用水を同様に投与した。

投与経路は OECD 化学物質試験法ガイドライン[421]に拠り、ラット用胃管による強制経口投与とした。

本試験の群構成および動物番号を以下に示した。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
					雄	雌
1	日局注射用水(媒体)	0	0	5	M01001～M01013	F01001～F01013
2	NBS	100	2	5	M02001～M02013	F02001～F02013
3	NBS	300	6	5	M03001～M03013	F03001～F03013
4	NBS	1000	20	5	M04001～M04013	F04001～F04013

5. 検査法

1) 親動物(F₀)

①一般状態の観察

全例について、飼育期間中毎日 1 回以上、投与期間中は投与前後の毎日 2 回以上観察した。

②体重測定

雄動物は、投与 1、7、14、21、28、35、42 日および剖検日に測定した。雌動物は投与 1、7、14 日、妊娠 0、7、14、20 日、哺育 0 および 4 日(剖検日)に、さらに交尾が確認されなかった雌では投与 21、28、35、42 日および剖検日、分娩が確認されなかった動物では妊娠 26 日相当日にも測定した。

③摂餌量測定

雄動物は、投与 1～2、7～8、14～15、29～30、35～36、41～42 日に測定した。雌動物は投与 1～2、7～8、14～15 日および妊娠 0～1、7～8、14～15、20～21 日ならびに哺育 3～4 日、さらに交尾が確認されなかった雌では投与 29～30、35～36、41～42 日にも測定した。

④性周期観察

各群とも全例の雌について、動物入荷翌日から性周期を観察し、群分け後、投与開始以降も引き続き膣スメア標本作製し、各動物の同居後、交尾が確認されるまで性周期を観察した。また、群ごとの平均発情回帰日数(個体ごとの発情期から発情期までの日数の平均)を算出した。なお、規則的に 4 日～5 日の間で回帰している動物は正常と判断した。

⑤交配

投与 15 日の夕方(15 時 59 分)より同群内の雌雄を 1 対 1 で同居させた。翌朝より毎朝、膣栓を確認し、同居中の雌の膣垢標本作製して鏡検した。膣内に膣栓あるいは膣垢標本中に精子が確認された動物を交尾成立動物とし、この日を妊娠 0 日と起算して同居を解消し、個別に飼育した。交配結果および妊娠の成否により、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期

の回数、交尾率 $[(\text{交尾動物数}/\text{交配に用いた動物数}) \times 100, \%)$ 、妊娠率 $[(\text{妊娠動物数}/\text{交尾した雌動物数}) \times 100, \%)$ を算出した。

⑥妊娠・分娩・哺育状態の観察

交尾が確認された全例を自然分娩させた。分娩の確認は、妊娠 21 日から分娩が確認されるまで毎日観察を行い、午前 11 時までには分娩が完了した例について、その日を哺育 0 日(分娩日)とした。分娩状態の直接観察は観察可能な動物について行い、直接観察できなかった動物についても分娩後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。分娩後は哺育状態を哺育 1～4 日の間、毎日観察した。分娩した全例の妊娠期間(妊娠 0 日から分娩日までの日数)を求め、各群の出産率 $[(\text{生児出産雌数}/\text{妊娠動物数}) \times 100, \%)$ を算出し、哺育 4 日の剖検時に観察した着床数および妊娠黄体数から着床率 $[(\text{着床数}/\text{妊娠黄体数}) \times 100, \%)$ を算出した。

⑦剖検および病理組織学的検査

雄動物は、投与 42 日の翌日に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させて剖検し、精巣、精巣上体、前立腺(腹側葉)および精囊(凝固腺を含む)の重量を測定した。精巣および精巣上体はブアン液に固定(長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液)し、前立腺、精囊および乳腺は 0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に固定した。精巣および精巣上体は対照群および 1000 mg/kg 投与群について、病理組織学的検査を実施した。また、剖検時に異常が認められた腎臓および精巣上体についても同様に固定し、病理組織学的検査を実施した。

雌動物のうち、分娩した雌は哺育 4 日に、交尾しなかった雌は投与 42 日の翌日に、交尾はしたが分娩しなかった雌は妊娠 26 日相当日に、それぞれペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させて剖検し、卵巣重量を測定した。卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮については着床数を数え、着床率 $[(\text{着床数}/\text{妊娠黄体数}) \times 100, \%)$ を算出した。未分娩であった雌動物は、10% 硫化アンモニウムで子宮を染色し、着床の有無を再確認した。また、乳腺、子宮、膈および卵巣は 0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に固定し、卵巣は対照群および 1000 mg/kg 投与群について、病理組織学的検査を実施した。

2) 出生児(F₁)

①出生児の観察

哺育 0 日に生存児数および死亡児数を雌雄別に数えて、性別および外表奇形の有無を観察し、分娩率 $[(\text{産児数}/\text{着床痕数}) \times 100, \%)$ 、生児出産率 $[(\text{出生児数}/\text{着床痕数}) \times 100, \%)$ および出生率 $[(\text{出生児数}/\text{産児数}) \times 100, \%)$ を算出した。哺育 0～4 日まで、毎日、一般状態を観察し、生存児数と死亡児数を雌雄別に数え、新生児生存率 $[(\text{哺育 4 日の生児数}/\text{哺育 0 日の生児数}) \times 100, \%)$ を算出した。生存児については、哺育 0 および 4 日に個別の体重を測定し、腹ごとに雌雄別の平均体重を算出するとともに、哺育 0 日および 4 日における性比 $[(\text{雄生児数}/\text{総生児数}) \times 100, \%)$ を算出した。

②剖検

死亡児は外表奇形の有無を観察して剖検し、0.1 M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に固定して保存した。生存児は哺育 4 日に外表奇形の有無を観察してセボフルラン吸入麻酔下により放血致死させて剖検し、内部器官の異常の有無を観察した。

6. データの解析法

性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率については Fisher の直接確率検定を行った(有意水準:5%)。

被験物質投与群の病理組織学検査所見のうち、グレード分けした病理組織所見は、Mann-Whitney の U 検定により、また陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により、1000 mg/kg 投与群と対照群との間の有意差検定を行った(有意水準:5%)。ただし、雌においては、哺育 4 日に剖検した動物の成績に関してのみ検定を実施した。

その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を1標本として、先ず、Bartlett の方法により各群の分散の一意性について検定(有意水準:5%)を行った。分散が一意であった場合には、一元配置型の分散分析(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められた場合は、Dunnett 法により多重比較を行った(有意水準:5%)。一方、いずれかの群で分散が 0 となった場合および分散が一意でなかった場合には、Kruskal-Wallis の順位検定(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った(有意水準:5%)。

試験成績

1. 親動物

1) 一般状態 (Table 1～ Table 4, Appendix 1～Appendix 4)

雌雄ともに死亡動物は観察されず、全試験期間を通じて一般状態の異常はみられなかった。

2) 体重 (Table 5～Table 8, Appendix 5～Appendix 8)

雌雄とも、全試験期間を通じて体重には対照群と NBS 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 摂餌量 (Table 9～Table 12, Appendix 9～Appendix 12)

雌雄とも、全試験期間を通じて摂餌量には対照群と NBS 各投与群との間に有意差は認められなかった。

4) 器官重量 (Table 13, Table 14, Appendix 13, Appendix 14)

雌雄ともに、測定した精巣、精巣上体、前立腺(腹側葉)、精囊(凝固腺を含む)、卵巣の重量には、対照群とNSB 各投与群との間に有意差は認められなかった。

5) 剖検所見 (Table 15, Table 16, Appendix 15, Appendix 16)

雄では、対照群の1例(動物番号M01007)の右側精巣および精巣上体に小型化が、100 mg/kg 投与群の1例(動物番号M02011)の左側腎臓に周囲淡色の嚢胞が、300 mg/kg 投与群の2例(動物番号M03007;左側、動物番号M03011;右側)の精巣上体尾部に黄白色結節が観察された。

雌では、肉眼的な異常所見は観察されなかった。

6) 病理組織学的検査 (Table 17, Table 18, Appendix 17, Appendix 18)

精巣では、対照群に精細管の限局性の萎縮が2例、生殖細胞の減少が2例に観察された。このうち1例は剖検時に肉眼的異常(小型化)が認められた例(動物番号M01007)であり、顕著な精細管の萎縮、生殖細胞の減少とともに軽度な水腫も認められた。1000 mg/kg 投与群では病理組織学的な異常は観察されなかった。

精巣上体では、対照群の2例(片側あるいは両側)において管腔内に細胞残屑が観察された。このうち1例は剖検時に肉眼的異常(小型化)が観察された例(動物番号M01007)であり、管腔内の精子の顕著な減少も観察された。その他、対照群および1000 mg/kg 投与群の各1例において、間質にリンパ球浸潤が認められたが、両群間では程度に差はなかった。剖検時に精巣上体に結節が認められた300 mg/kg 投与群の2例では、精子肉芽腫が観察された。

剖検時に、腎臓に嚢胞が観察された100 mg/kg 投与群の雄1例では、皮質に塩基性尿細管および間質に限局性のリンパ球浸潤が認められた。

卵巣では、対照群および1000 mg/kg 投与群の全例に、病理組織学的な異常所見は観察されなかった。

2. 生殖能力

1) 性周期および交配成績 (Table 19, Table 20, Appendix 19, Appendix 20)

性周期には、NSB 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

交配の結果、交配期間中に交尾が確認されなかった動物が対照群の1例(動物番号F01006)、交尾は確認されたが不妊であった動物が1000 mg/kg 投与群に1例(動物番号F04008)認められたが、交尾率および受胎率にはNSB 投与の影響はみられなかった。また、交尾までの日数およびその間の発情回数にも、対照群とNSB 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 出産率および妊娠期間 (Table 21, Appendix 21)

1000 mg/kg 投与群の1例が出産しなかったが(後述)、他の動物は妊娠22~23日に出産した。出産率および妊娠期間には、対照群とNSB 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 分娩および哺育状態 (Table 21, Appendix 21)

出産をしなかった 1 例を除き(後述)、その他全例の妊娠動物が正常に分娩した。妊娠期間および出産率には対照群と NBS 投与群との間に有意差は認められなかった。また、哺育状態にも異常は認められなかった。

4) 黄体数、着床数および着床率 (Table 21, Appendix 21)

1000 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 F04008)は、妊娠 25 日までに分娩が確認されなかった。妊娠 26 日相当日に剖検の結果、着床痕が確認されなかったことから不妊であると判断し、妊娠期以降の成績は全て評価対象から除外した。その他、黄体数、着床数および着床率には、対照群と NBS 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3. 出生児

1) 生存 (Table 21, Table 23, Appendix 21, Appendix 23)

分娩率、生児出産率、出生率、新生児生存率および性比には、対照群と NBS 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 体重 (Table 22, Appendix 22)

哺育 0 および 4 日における出生児の体重には、対照群と NBS 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 出生児観察 (Table 23, Table 24, Appendix 23)

哺育 0～4 日における生存児に外形異常は観察されなかった。また、哺育 4 日に剖検した結果、異常は認められなかった。

死亡児は、対照群を含む各投与群に認められたが、死亡時期および死亡児数に特定の傾向は認められなかった。

死亡児には、母動物による食害により存在が不明になったと推察される児(不明児)、あるいは死後経過が進み自己融解により内臓観察ができなかった児を含むが、剖検が可能であった死亡児には外形異常は観察されず、内臓観察が可能であった死亡児についても、内臓に異常は認められなかった。

考察

雌雄ラットの交配前(2 週間)および交配期間中ならびに、雄では交配期間終了後、計 42 日間、雌では妊娠期間を通して周産期(哺育 3 日まで)に NBS を経口投与し、雌雄ラットに対する生殖毒性について検討した。

試験期間中、雌雄ともに死亡は認められず、一般状態にも異常は観察されなかった。

体重、摂餌量にも、NBS 投与による変化は認められなかった。

剖検時に、300 mg/kg 投与群の 2 例で精巣上体に精子肉芽腫が認められたが、交配相手雌は妊娠して正常に出産し、出産児数、出生児の生存性、形態学変化においても異常はなかった。さらに、1000

mg/kg 投与群には認められていないこと、自然発生的に認められる所見であることから、NBS 投与による変化ではないと判断した。また、100 mg/kg 投与群の 1 例の腎臓で嚢胞が観察されたが、その他の動物には同様な変化は観察されていないことから、自然発生所見であり NBS 投与による変化ではないと考えられた。

交尾は確認されたが不妊であった動物が 1000 mg/kg 投与群に 1 例観察された。しかし、この雌動物の性周期は正常に規則的に回帰しており、剖検所見および卵巣の病理組織学検査においても異常は認められていない。また、交配相手雄動物にも剖検所見および精巣および精巣上体の病理組織学的検査に異常は認められていない。不妊であった動物は 1 例だけであったことから、偶発的な変化であり、NBS 投与による変化ではないと判断した。

交尾率、受胎率、黄体数、着床数および着床率には NBS 投与による影響は認められなかった。また、分娩および哺育にも、NBS 投与による影響はなかった。さらに児の生存率、体重にも NBS 投与による影響はなかった。

以上の結果から、本試験条件下における NBS の親動物に対する一般毒性学的無毒性量は 1000 mg/kg/day、生殖発生毒性学的な無毒性量ならびに次世代に対する無毒性量も 1000 mg/kg/day であると考えられた。

参考文献

- 1) 3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験 (http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper127-68-4b.html)

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 1.General conditions of male rats

Group	Number of males and general signs	Days 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								
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post									
Distilled water (vehicle)	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13							
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13					
NBS 100 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13					
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13			
NBS 300 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13				
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
NBS 1000 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 1 (continued). General conditions of male rats

Group	Number of males and general signs	Days of administration																																					
		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39		40		41		42		43			
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Distilled water (vehicle)	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
NBS 100 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
NBS 300 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
NBS 1000 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
Pre: Before administration, Post: after administration.																																							

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 2. General conditions of female rats

Group	Number of females and general conditions	Days 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																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
Distilled water (vehicle)	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 2 (continued). General conditions of female rats

Group	Number of females and general signs	Days of administration																							
		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Distilled water (vehicle)	Number of females	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	General appearance, No abnormality	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 3. General conditions of dams during pregnancy

Group	Number of dams and general conditions	Days of pregnancy																													
		0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Distilled water (vehicle)	Number of dams	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	12	12	12	12	
	General appearance, No abnormality	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	12	12	12	12	
NBS 100 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
NBS 300 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
NBS 1000 mg/kg	Number of dams	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	12	12	12	12	
	General appearance, No abnormality	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	12	12	12	12	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 3 (continued). General conditions of dams during pregnancy

Group	Number of dams and general signs	Days of pregnancy																					
		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Distilled water (vehicle)	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	5	0	0	0	0	0	0
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	5	0	0	0	0	0	0
NBS 100 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	3	3	0	0	0	0	0	0
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	3	3	0	0	0	0	0	0
NBS 300 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	4	4	1	0	0	0	0	0
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	4	4	1	0	0	0	0	0
NBS 1000 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	3	0	0	0	0	0	0
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	3	0	0	0	0	0	0

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 4. General conditions of dams during lactation

Group	Number of dams and general conditions	Days of lactation								
		0		1		2		3		4
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre
Distilled water (vehicle)	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12
NBS 100 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13
NBS 300 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13
NBS 1000 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 5. Body weights of male rats

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of males	13	13	13	13
Days of administration				
1	383.1 ± 13.4	383.1 ± 15.3	386.9 ± 13.1	385.1 ± 15.4
7	408.0 ± 17.4	407.9 ± 22.3	409.9 ± 16.6	408.6 ± 20.2
14	436.8 ± 17.1	428.3 ± 29.9	435.6 ± 20.1	434.6 ± 23.7
21	453.3 ± 17.1	450.8 ± 35.5	457.4 ± 20.9	459.9 ± 25.6
28	474.5 ± 18.8	473.8 ± 38.2	480.6 ± 25.0	481.9 ± 29.3
35	492.1 ± 20.6	490.3 ± 41.9	502.1 ± 29.0	504.1 ± 33.6
42	506.6 ± 27.3	505.3 ± 44.2	521.7 ± 33.5	524.3 ± 36.6

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 6. Body weights of female rats

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
1	238.7 ± 7.8	238.1 ± 10.6	240.8 ± 10.6	239.8 ± 10.9
7	246.0 ± 12.1	246.1 ± 11.5	247.8 ± 12.1	246.7 ± 12.4
14	256.6 ± 13.3	255.6 ± 14.2	255.0 ± 12.3	255.2 ± 14.3

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 7. Body weights of dams during pregnancy

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of dams	12	13	13	12
Days of pregnancy				
0	268.1 ± 12.0	264.0 ± 14.2	267.1 ± 13.9	266.2 ± 9.8
7	304.6 ± 10.3	300.1 ± 17.2	303.0 ± 13.9	304.5 ± 13.4
14	341.5 ± 13.6	335.5 ± 17.8	338.8 ± 17.8	342.0 ± 17.3
20	420.0 ± 12.7	411.9 ± 26.2	417.8 ± 23.3	423.6 ± 27.8

Each value shows mean ± S.D. (g).

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 8. Body weights of dams during lactation

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of dams	12	13	13	12
Days of lactation				
0	307.2 ± 15.3	302.0 ± 20.5	302.7 ± 23.1	315.1 ± 19.2
4	336.0 ± 10.6	333.4 ± 20.4	339.0 ± 21.3	336.8 ± 21.1

Each value shows mean ± S.D. (g).

Significantly different from the control group (*: $P<0.05$, **: $P<0.01$).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 9. Food consumption of male rats

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of males	13	13	13	13
Days of administration				
1	29.4 ± 2.8	29.8 ± 3.5	30.3 ± 1.3	29.3 ± 3.1
7	28.8 ± 2.8	28.0 ± 2.7	29.2 ± 2.7	29.1 ± 3.2
14	29.1 ± 2.7	30.3 ± 3.1	30.5 ± 2.7	30.1 ± 2.6
29	28.7 ± 2.8	29.1 ± 2.6	29.5 ± 3.4	29.8 ± 2.7
35	29.6 ± 3.5	30.3 ± 3.8	30.4 ± 2.7	31.6 ± 3.0
41	28.7 ± 3.2	29.4 ± 3.1	31.2 ± 3.1	31.3 ± 3.3

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 10. Food consumption of female rats

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
1	20.9 ± 2.7	20.0 ± 3.9	19.5 ± 3.5	19.2 ± 3.2
7	18.9 ± 3.2	20.3 ± 3.0	18.4 ± 3.3	18.2 ± 2.2
14	21.4 ± 3.9	21.7 ± 2.6	20.8 ± 3.3	22.5 ± 2.3

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from the control group (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 11. Food consumption of dams during pregnancy

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of dams	12	13	13	12
Days of pregnancy				
0	21.4 ± 2.5	21.0 ± 2.8	19.4 ± 2.8	20.2 ± 2.9
7	26.3 ± 2.1	26.3 ± 2.6	25.7 ± 2.9	27.3 ± 1.9
14	26.8 ± 1.5	25.9 ± 2.1	26.5 ± 3.4	27.4 ± 2.8
20	22.0 ± 4.5	21.3 ± 4.1	20.5 ± 5.1	23.2 ± 3.7

Each value shows mean ± S.D. (g).

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 12. Food consumption of dams during lactation

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of dams	12	13	13	12
Days of lactation	3			
	43.8 ± 5.5	44.9 ± 5.1	45.2 ± 4.8	43.0 ± 7.0

Each value shows mean ± S.D. (g).

Significantly different from the control group (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 13. Organ weights of male rats

Group		Distilled water (vehicle)		NBS 100 mg/kg		NBS 300 mg/kg		NBS 1000 mg/kg	
Number of males		13		13		13		13	
Body weight	(g)	508.0	± 27.4	506.7	± 43.7	522.4	± 32.7	526.9	± 35.4
Testes	(mg)	3257.2	± 318.8	3202.0	± 258.9	3227.2	± 212.4	3324.9	± 309.7
	(mg/g)	6.415	± 0.595	6.354	± 0.650	6.207	± 0.646	6.330	± 0.644
Epididymides	(mg)	1218.7	± 147.8	1219.5	± 83.9	1234.4	± 78.8	1276.5	± 108.9
	(mg/g)	2.397	± 0.250	2.424	± 0.266	2.372	± 0.221	2.429	± 0.217
Prostate, ventral	(mg)	647.6	± 200.3	645.5	± 138.9	662.4	± 140.9	665.0	± 163.0
	(mg/g)	1.273	± 0.379	1.282	± 0.291	1.272	± 0.274	1.266	± 0.321
Seminal vesicles	(mg)	1677.9	± 300.7	1929.3	± 255.4	1870.6	± 268.5	1921.7	± 223.1
	(mg/g)	3.310	± 0.624	3.816	± 0.472	3.598	± 0.592	3.663	± 0.484

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 14. Organ weights of female rats

Group		Distilled water (vehicle)		NBS 100 mg/kg		NBS 300 mg/kg		NBS 1000 mg/kg	
Number of females		12		13		13		12	
Body weight	(g)	336.0	± 10.6	333.4	± 20.4	339.0	± 21.3	336.8	± 21.1
Ovaries	(mg)	99.5	± 6.9	99.4	± 15.8	98.1	± 12.6	95.4	± 10.2
	(mg/g)	0.296	± 0.021	0.298	± 0.039	0.289	± 0.026	0.285	± 0.04

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 15. Macroscopic findings of male rats

	Group	Distilled water (vehicle)		NBS 100 mg/kg		NBS 300 mg/kg		NBS 1000 mg/kg	
Findings	Grade	-	P	-	P	-	P	-	P
Epididymis									
Nodule, yellowish-white, caudal, unilateral		13	0	13	0	11	2	13	0
Small, unilateral		12	1	13	0	13	0	13	0
Kidney									
Cyst, pale color ^{a)} , unilateral		13	0	12	1	13	0	13	0
Testis									
Small, unilateral		12	1	13	0	13	0	13	0

Notes) - : No abnormal changes P : Non-graded change

a) around the cyst

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 16. Macroscopic findings of female rats

Findings	Group	Distilled water (vehicle)		NBS 100 mg/kg		NBS 300 mg/kg		NBS 1000 mg/kg	
	Grade	-	P	-	P	-	P	-	P
All organs and tissues		12		13		13		12	

Notes) - : No abnormal changes P : Non-graded change

Numerals represent the number of animals.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 17. Histopathological findings of male rats

Findings	Group	Distilled water (vehicle)							NBS 100 mg/kg							NBS 300 mg/kg							NBS 1000 mg/kg						
	Grade	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE
Testis																													
Atrophy, seminiferous tubule, unilateral		11	1	0	0	1																	13	0	0	0	0		
Decrease, germ cell		11	1	0	0	1																	13	0	0	0	0		
Edema, unilateral		12	0	1	0	0																	13	0	0	0	0		
Epididymis																													
Cell debris, lumen, uni-/bilateral		11	1	1	0	0										2	0	0	0	0		11	13	0	0	0	0		
Cellular infiltration, lymphocyte interstitial		12	1	0	0	0										2	0	0	0	0		11	12	1	0	0	0		
Decrease, sperm, lumen, unilateral		12	0	0	0	1										2	0	0	0	0		11	13	0	0	0	0		
Granuloma, spermatic, unilateral		13	0	0	0	0										0	0	2	0	0		11	13	0	0	0	0		
Kidney																													
Basophilic tubule, cortex									0	1	0	0	0		12														
Cellular infiltration, lymphocyte, focal									0	1	0	0	0		12														

Notes) -: No abnormal changes ±: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked

P: Non-graded change NE: Not examined

Numerals represent the number of animals.

Not significantly different from control.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 18. Histopathological findings of female rats

Findings	Group	Distilled water (vehicle)							NBS 100 mg/kg							NBS 300 mg/kg							NBS 1000 mg/kg						
	Grade	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE
Ovary		12																					12						

Notes) - : No abnormal changes ±: Very slight + : Slight 2+: Moderate 3+: Marked

P : Non-graded change NE: Not examined

Numerals represent the number of animals.

Not significantly different from control.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 19. Results of observations about estrous cycle

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of animals examined	13	13	13	13
<u>Pre-treatment period</u>				
Number of animals showing the each type of regular estrous cycle				
4-day cycle	10	11	12	9
4 and 5-day cycle	1	1	1	1
5-day cycle	2	1	0	3
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D.	4.2 ± 0.4	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.1	4.3 ± 0.4
<u>Treatment period</u>				
Number of animals showing each type of cycle				
4-day cycle	11	9	12	9
4 and 5-day cycle	1	3	1	3
5-day cycle	0	1	0	1
Irregular	1	0	0	0
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D.	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.3
Frequency of animals of which type of estrus cycle was changed after the treatment	3 / 13	5 / 13	2 / 13	6 / 13
Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean±S.D.	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.0

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 20. Results of observations about reproductive performance

Group	Distilled water (vehicle)			NBS 100 mg/kg			NBS 300 mg/kg			NBS 1000 mg/kg		
Number of mated pairs [A]	13			13			13			13		
Number of copulated pairs [B]	12			13			13			13		
Copulation index [(B/A)×100,%]	92.3			100.0			100.0			100.0		
Number of fertile males [C]	12			13			13			12		
Fertility index [(C/B)×100,%]	100.0			100.0			100.0			92.3		
Pairing days until copulation												
; Mean±S.D.	2.3	±	1.4	2.2	±	1.2	2.9	±	1.7	2.2	±	1.1

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 21. Observation of offspring (F₁)

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of dams	12	13	13	12
Gestation length (days)				
Mean ± S.D. per dam	22.4 ± 0.5	22.2 ± 0.4	22.3 ± 0.5	22.3 ± 0.5
Number of corpora lutea				
Total	190	203	209	187
Mean ± S.D. per dam	15.8 ± 1.3	15.6 ± 1.4	16.1 ± 2.5	15.6 ± 1.8
Number of implantation scars				
Total	186	196	201	184
Mean ± S.D. per dam	15.5 ± 1.2	15.1 ± 1.9	15.5 ± 2.3	15.3 ± 2.1
Implantation index (%) ^{a)}	98.0 ± 3.8	96.5 ± 7.5	96.4 ± 5.1	98.2 ± 3.4
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of offspring at birth				
Total	169	183	187	174
Mean ± S.D. per dam	14.1 ± 2.3	14.1 ± 2.1	14.4 ± 1.6	14.5 ± 2.3
Number of live offspring at birth				
Male	78	80	95	91
Female	88	102	88	82
Total	166	182	183	173
Mean ± S.D. per dam	13.8 ± 2.3	14.0 ± 2.0	14.1 ± 1.6	14.4 ± 2.4
Sex ratio ^{c)}				
Mean ± S.D. per dam	0.48 ± 0.12	0.44 ± 0.15	0.52 ± 0.13	0.53 ± 0.13
Number of stillbirths				
Total	3	1	4	1
Mean ± S.D. per dam	0.3 ± 0.6	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.6	0.1 ± 0.3
Delivery index ^{d)}				
Mean% ± S.D. per dam	90.5 ± 12.7	93.2 ± 6.4	93.7 ± 7.4	94.3 ± 6.4
Birth index ^{e)}				
Mean% ± S.D. per dam	88.9 ± 12.6	92.7 ± 6.1	91.7 ± 7.7	93.7 ± 6.8
Live birth index ^{f)}				
Mean% ± S.D. per dam	98.3 ± 4.2	99.5 ± 1.6	98.0 ± 4.3	99.4 ± 2.0
Number of offspring on day 4				
Male	77	80	94	87
Female	85	101	86	81
Sex ratio ^{c)}				
Mean ± S.D. per dam	0.48 ± 0.12	0.45 ± 0.14	0.52 ± 0.13	0.53 ± 0.13
Viability index ^{g)}				
Mean% ± S.D. per dam	97.6 ± 4.9	99.5 ± 1.9	98.5 ± 3.9	97.3 ± 7.8
Number of external abnormalities ^{h)}	0	0	0	0
Mean% ± S.D. per dam	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

a): (Number of implantation scars/Number of corpora lutea)×100.

b): (Number of dams with live offspring/number of pregnant dams)×100.

c): Number of male offspring/(number of male offspring + number of female offspring).

d): (Number of offspring at birth/Number of implantation scars)×100.

e): (Number of live offspring at birth/number of implantation scars)×100.

f): (Number of live offspring at birth/number of offspring at birth)×100.

g): (Number of live offspring 4 days after birth/number of live offspring at birth)×100.

h): Number of external abnormalities in live offspring at birth.

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 22. Body weights of offspring (F₁)

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Number of dams	12	13	13	12
Male				
Days after birth				
0	6.9 ± 0.6	6.8 ± 0.5	6.8 ± 0.4	6.8 ± 0.7
4	11.5 ± 1.1	11.2 ± 0.9	10.9 ± 0.7	10.6 ± 1.9
Number of dams	12	13	13	12
Female				
Days after birth				
0	6.4 ± 0.6	6.4 ± 0.4	6.2 ± 0.3	6.4 ± 0.7
4	10.7 ± 1.0	10.6 ± 1.0	10.1 ± 0.7	10.1 ± 1.6

Each value shows mean ± S.D. per dam. (g).

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 23. General conditions in offspring (F₁)

Group	Number of offspring and general conditions	Days after birth				
		0	1	2	3	4
Distilled water (vehicle)	Number of offspring	166	166	163	162	162
	General appearance, No abnormality	166	163	162	162	162
	General appearance, Death		3	1		
NBS 100 mg/kg	Number of offspring	182	182	181	181	181
	General appearance, No abnormality	182	181	181	181	181
	General appearance, Death		1			
NBS 300 mg/kg	Number of offspring	183	183	180	180	180
	General appearance, No abnormality	183	180	180	180	180
	General appearance, Death		3			
NBS 1000 mg/kg	Number of offspring	173	173	171	168	168
	General appearance, No abnormality	173	171	168	168	168
	General appearance, Death		2	3		

Reproduction/developmental toxicity screening test of sodium 3-nitrobenzenesulphonate by oral administration in rats

Table 24. Morphological findings of offspring (F₁)

Group	Distilled water (vehicle)	NBS 100 mg/kg	NBS 300 mg/kg	NBS 1000 mg/kg
Dead pups				
Number of dead pups ^{a)}	7	2	7	6
Number of missing pups	3	1	3	4
Number of dead pups examined	4	1	4	2
Number of dead pups with external changes	0	0	0	0
Number of dead pups with visceral changes	0	0	0	0
Live pups				
Number of live pups examined (postnatal day 0)	166	182	183	173
Number of live pups with external changes	0	0	0	0
Number of live pups examined (postnatal day 4)	162	181	180	168
Number of live pups with external changes	0	0	0	0
Number of live pups with visceral changes	0	0	0	0

Significantly different from the control group (*: p<0.05, **: p<0.01).

a): including missing pups.