

最終報告書

1-メトキシカルボニルペンタデカンスルホン酸ナトリウムの
ラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

(試験番号：99-173)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要 約	1
緒 言	2
目 的	2
材料および方法	
1. 被験物質	2
2. 動物および飼育条件	3
3. 投与量の設定, 試験群の構成および投与方法	4
4. 観察および検査	
1) 親動物に関する項目	
(1) 一般状態観察	5
(2) 体重および摂餌量測定	5
(3) 性周期検査	5
(4) 交配および分娩状態観察	5
(5) 尿検査	6
(6) 血液学検査	6
(7) 血液生化学検査	7
(8) 剖検および器官重量測定	7
(9) 病理組織学検査	7
2) 新生児に関する項目	
(1) 産児数, 性比および外表異常の観察	8
(2) 一般状態観察	8
(3) 体重測定	8
(4) 病理学検査	9
5. 統計解析	9
結 果	
1. 反復投与毒性	
1) 死亡	10
2) 一般状態	10
3) 体重	10
4) 摂餌量	10
5) 雄の尿検査	10
6) 血液学検査	11
7) 血液生化学検査	11
8) 剖検	11
9) 器官重量	11

10) 病理組織学検査	
(1)生殖器系以外の器官	12
(2)生殖器系器官	12
2. 生殖発生毒性	
1) 親動物に及ぼす影響	
(1)性周期検査	13
(2)交尾率および受胎率	13
(3)黄体数, 着床数および着床率	13
(4)出産率および妊娠期間	13
(5)分娩および哺育状態	13
2) 新生児に及ぼす影響	
(1)生存性および体重	14
(2)形態	14
考 察	
1. 反復投与毒性について	15
2. 生殖発生毒性について	16
文 献	17

添付資料

A. 図・群別平均値表

Figures	1, 2	体重	1
Figures	3, 4	摂餌量	3
Tables	1, 2	死亡率	5
Tables	3, 4	一般状態	7
Tables	5, 6	体重	9
Tables	7, 8	摂餌量	11
Tables	9	尿検査	13
Tables	10, 11	血液学検査	15
Tables	12, 13	血液生化学検査	17
Tables	14, 15	剖検	19
Tables	16, 17	器官重量	21
Tables	18, 19	病理組織学検査	23
Table	20	親動物の生殖能に及ぼす影響	29
Table	21	新生児の発生に及ぼす影響	30
Table	22	新生児の外表検査	31
Table	23	新生児の内臓検査	32

要 約

1-メトキシカルボニルペンタデカンスルホン酸ナトリウムの0, 5, 20, 80および300 mg/kg/dayを, 1群10匹のSD系ラットに, 交配開始14日前から, 雄は47日間, 雌は分娩後哺育4日まで経口投与し, 本物質の反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

1. 反復投与毒性

一過性の軽度な軟便が, 80および300mg/kg群で雌雄の一部に認められた。血液生化学検査において, 300mg/kg群で雄に, GPTの有意な増加およびトリグリセライドの有意な減少が認められた。剖検において, 80および300mg/kg群で雌雄に, 前胃の粘膜肥厚が認められ, 病理組織学的には, 角化亢進を伴う重層扁平上皮の過形成, びらん, ならびに粘膜固有層・粘膜下織の浮腫および炎症性細胞浸潤が認められた。体重, 摂餌量, 尿検査, 血液学検査および器官重量においては, 変化は認められなかった。

以上の結果から, 1-メトキシカルボニルペンタデカンスルホン酸ナトリウムのラットにおける主な反復投与毒性は, 前胃に対する影響であった。また, 軽度な血液生化学的影響も認められた。無影響量は, 雌雄とも, 20mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

親動物の交尾率, 受胎率, 妊娠期間, 黄体数, 着床率, 出産率, 分娩率, 分娩および哺育状態に変化は認められなかった。児動物に対しても, 総出産児数, 新生児数, 性比, 出生率, 体重, 形態および哺育4日生存率に, 被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

したがって, 雌雄親動物の生殖能および児動物の発生に対する無影響量は, いずれも300mg/kg/dayと推定された。

緒 言

1-メトキシカルボニルペンタデカンスルホン酸ナトリウムは、アルファスルホ脂肪酸エステル塩(α -SF)に属するアニオン系界面活性剤で、主に洗濯用洗剤の原料として用いられている。本物質以外に合成洗剤の原料として用いられているアニオン系界面活性剤として、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)、アルファオレインスルホン酸塩(AOS)、アルキルエーテル硫酸エステル塩(AES)、アルキル硫酸エステル塩(AS)、脂肪酸塩等がある。1960～70年代にかけて、合成洗剤による人体への影響が社会問題化したため、当時洗剤に使用されていたLAS、AES、AOS、ASおよび脂肪酸塩については、厚生省、科学技術庁、地方自治体等の研究機関で各種の毒性試験が実施され、厚生省はそれらの結果も含めて洗剤の安全性に関する評価を行い、1983年に「洗剤の毒性とその評価」¹⁾として公表している。しかしながら、その後洗剤の原料として広く用いられた α -SFに属する界面活性剤の安全性については、公表された文献は見あたらない。

被験物質である1-メトキシカルボニルペンタデカンスルホン酸ナトリウムの入手先の社内資料では、本物質のラット急性経口LD₅₀値は1000～2000mg/kgの範囲²⁾で、ラットを用いた経皮投与による28日間の反復投与毒性試験³⁾および催奇形性試験⁴⁾では、投与部位に刺激性反応が認められた以外に変化は認められず、また細菌を用いる復帰突然変異試験⁵⁾および哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験⁶⁾でいずれも陰性とされている。しかしながら、経口投与による反復投与毒性および生殖発生毒性については、知られていない。

目 的

この試験は、OECDにおける高生産量既存化学物質の安全性点検プログラムの一環として実施したものであり、1-メトキシカルボニルペンタデカンスルホン酸ナトリウムをラットに反復経口投与し、本物質の反復経口投与毒性および生殖発生毒性を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

1-メトキシカルボニルペンタデカンスルホン酸ナトリウム (CAS No. 4016-24-4) は、

分子量が373.51または374.51で、DMSOに溶けやすく、食物油にやや溶けやすく、水に僅かに溶け、アセトンにほとんど溶けない白色の粉体である。試験には、

被験物質の投与液は、局方オリブ油（宮澤薬品株式会社、ロット番号 HD18）を媒体とし、所定の投与用量となる濃度に懸濁して調製した。調製した投与液は、1日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所（4℃）、遮光下で密栓して保管した。投与液中の被験物質は、少なくとも8日間は安定であることが確認された（Appendix 2）ので、調製後8日以内に使用した。初回と最終回に調製された投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した（Appendix 3）。被験物質の分析のうち、原体の分析は、外部機関に委託して実施した。

動物は、SD系 [Crj:CD(SD)IGS]ラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県厚木市下古沢 795）から8週齢のものを搬入（雌雄各60匹）し、13日間試験環境に馴化させた。馴化期間中に検疫および雌については10日間の性周期観察も併せて行い、発育および一般健康状態が良好で、雌では性周期に異常の認められない雌雄各50匹を、10週齢で試験に用いた。1群の動物数は雌雄各10匹とし、群分けは投与開始前日の体重に基づく層化無作為抽出法を用いて行った。投与開始時の平均体重（体重範囲）は、雄 394(364~420)g、雌 243(223~264)gであった。

収容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料（固型飼料ラボMRストック、日本農産工業株式会社、ロット番号 000561）および飲料水（孔径 1 μ m のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水）は、それぞれ給餌器および自動給水装置、または給水瓶（ポリカーボネートケースの場合）により、自由に摂取させた。

動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付、ならびに耳パンチ法により行った。

飼育期間中、動物室の温度は22.1～24.2℃、湿度は43～55%の範囲で推移（Appendix 4）し、また飼料、飲料水および巣作り材料の汚染物質の分析結果（Appendices 5, 6, 7）は、いずれも当研究所で設定した許容範囲内にあることが確認された。したがって、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化は、なかったものと判断された。

3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

投与量を設定するため、被験物質の 0, 30, 100, 300, 500 および 1000mg/kg/day を、1 群雌雄各 4 匹のラットに、14 日間反復経口投与した。その結果、500mg/kg 群で雌雄に軽度の軟便、1000mg/kg 群で雌雄に下痢、自発運動低下、体重および摂餌量の減少、ならびに雄 3 匹および雌 1 匹の死亡が認められた。血液学検査では、1000mg/kg 群で雌雄に血小板数の増加、活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が認められた。血液生化学検査では、500mg/kg 群で雄に GPT の増加、1000mg/kg 群で雌雄に GPT の増加、血糖値の減少、雌に尿素窒素の減少が認められた。剖検では、100mg/kg 以上の群で雌雄に前胃の粘膜肥厚および表面粗さ、1000mg/kg 群の死亡例では胃の液状物貯留による膨満、前胃の粘膜剥離、腺胃の粘膜黒色点、腸の粘液様物貯留が認められた。器官重量では、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。また、500mg/kg 以下の群について、投与 7 日から雌雄を 1 : 1 で同居させた結果、交尾能に対する影響は認められなかった。

以上の結果から、本物質の主な反復投与毒性は、局所刺激性による消化管、特に胃に対する影響と推察された。また、肝臓や血液に対する影響を有する可能性も考えられた。また、本試験における投与量については、確実に反復投与毒性が発現すると予測される 300mg/kg/day を最高用量、毒性影響が発現しないと予測される 5 mg/kg/day を最低用量

とし、これらの用量の間に80および20mg/kg/dayの計4用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群（以下、対照群）、②被験物質の5 mg/kg/day投与群（5 mg/kg群）、③同 20mg/kg/day投与群（20mg/kg群）、④同 80mg/kg/day投与群（80 mg/kg群）、⑤同 300mg/kg/day投与群（300mg/kg群）の5群とした。

投与方法は、投与液量を体重1 kg当たり5 mLとし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には、媒体として用いた局方オリブ油を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始14日前から、雄は47日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育4日まで、最短42日～最長55日間、1日1回、概ね午前中（9：10～12：12）に投与した。

4. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、朝夕の少なくとも2回は、動物の生死、外観、行動等について観察した。特に、妊娠、出産、哺育の状態については、注意深く観察した。

(2) 体重および摂餌量測定

体重は、雄については投与1（投与開始日）、8、15、22、29、36、43および47日、雌は投与1、8および15日、妊娠0、7、14および20日、哺育0および4日に測定した。さらに、屠殺日あるいは死亡発見日にも測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて、ケージごとに翌日までの24時間飼料消費量を測定した。ただし、摂餌量の最終測定日は、雄では投与46日、雌では哺育3日とした。交配期間中の投与15日には雌雄の全例、投与22日には交尾が成立していない雌雄の摂餌量は測定しなかった。

(3) 性周期検査

雌について、馴化・検疫期間に引き続き、交尾が確認されるまで、Giemsa染色による膣垢塗抹標本を作製し、鏡検により性周期段階の判定を行った。

(4) 交配および分娩状態観察

交配前2週間の投与を終了（投与15日の午後）した雌雄を同一群内で1対1の組み合

わせを作り，2週間を限度として交尾が確認されるまで連続同居させた．交配期間中は毎朝一定時刻（9:30頃）に交尾の確認を行い，交尾率(%) $[(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100]$ を算出した．交尾は，膣栓形成あるいは膣垢中の精子の有無により確認し，確認された日を妊娠0日とした．分娩状態の観察も同じ時刻に行い，分娩の完了が確認された日を哺育0日とした．交配および分娩の観察結果から，各群について，受胎率(%) $[(\text{受胎雌数} / \text{交尾成立雌数}) \times 100]$ および出産率(%) $[(\text{生児出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100]$ を算出した．

(5)尿検査

雄について，投与41日あるいは42日に，腰部を刺激して新鮮尿を採取し，試験紙法（マルティスティックス，バイエル・三共株式会社）による pH，潜血，タンパク，糖，ケトン体，ビリルビンおよびウロビリノーゲンの定性的検査を行った．さらに，動物を代謝ケージに約3時間収容して得た蓄尿について，外観の観察，比重の測定（屈折計，エルマ光学株式会社），沈渣の検査（URI-CELL液，ケンブリッジケミカルプロダクト社，で染色して鏡検）を行った．

(6)血液学検査

雌雄について，最終投与の翌日の解剖直前に，エーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より採血した．動物は前日の午後5時より除餌し，水のみを給与した．採取した血液は3分割し，その一部はEDTA-2Kで凝固阻止処理し，多項目自動血球計数装置（E-4000，東亜医用電子株式会社）により，赤血球数（電気抵抗検出方式），血色素量（ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法），ヘマトクリット値（パルス検出方式），平均赤血球容積，平均赤血球血色素量，平均赤血球血色素濃度（以上，計算値），白血球数および血小板数（以上，電気抵抗検出方式）を，また塗抹標本を作製して網状赤血球数

（Brilliant cresyl blue 染色して鏡検）および白血球百分率（May-Giemsa染色して鏡検）を測定した．また，血液の一部を3.8%クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を得，血液凝固自動測定装置（KC-10A，米国アメルング社）により，プロトロンビン時間（Quick 一段法）および活性化部分トロンボプラスチン時間（エラヂン酸活性化法）を測定した．

(7) 血液生化学検査

採取した血液の一部から血清を分離し、生化学自動分析装置（JCA-BM 8 型クリナライザー、日本電子株式会社）により、総タンパク（ビューレット法）、アルブミン（BCG 法）、A/G 比（計算値）、血糖（GluK¹⁾-G-6-PDH²⁾法）、総コレステロール（酵素法、CES³⁾-CO⁴⁾-POD⁵⁾系）、トリグリセライド（酵素法、LPL⁶⁾-GK⁷⁾-GPO⁸⁾-POD⁵⁾系）、総ビリルビン（ジアゾ法）、尿素窒素（ウレアーゼ・UV法）、クレアチニン（Jaffe法）、GOT、GPT、 γ -GTP、ALP（以上、JSCC⁹⁾法）、LDH（SFBC法¹⁰⁾）、カルシウム（OCPC法）および無機リン（酵素法、PNP¹¹⁾-XOD¹²⁾-POD⁵⁾系）を、また電解質自動分析装置（NAKL-132、東亜電波工業株式会社）により、ナトリウム、カリウムおよび塩素（以上、イオン電極法）を測定した。

- 1) グルコキナーゼ、2) グルコース-6-リン酸脱水素酵素、3) コレステロールエステラーゼ、4) コレステロールオキシダーゼ、5) ベルオキシダーゼ、6) リポプロテインリパーゼ、7) グリセロールキナーゼ、8) L- α -グリセリン酸オキシダーゼ、9) 日本臨床化学会、10) フランス臨床生物学会、11) グリンスクレオジホスホリラーゼ、12) キンチンオキシダーゼ

(8) 剖検および器官重量測定

死亡動物は発見後速やかに、また、生存動物については、雄の計画屠殺動物は投与47日の翌日、雌では分娩し哺育も順調であった例は哺育5日、交配の成立しなかった例は交配期間終了後24日（投与51日の翌日）、交配は成立したが分娩予定の4日後まで分娩が認められなかった例はその翌日、哺育期間中に全児が死亡した例は全児死亡が確認された日に、それぞれエーテル麻酔下で放血屠殺し、体表、開口部粘膜および内部諸器官を肉眼的に観察した。また、生存動物については、肝臓、腎臓、副腎、胸腺、脾臓、脳、心臓および雄ではさらに精巣、精巣上体を秤量（絶対重量）し、屠殺日の体重に基づいて対体重比（相対重量）を算出した。雌については、卵巣の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率(%) [(着床数/黄体数)×100]を算出した。

(9) 病理組織学検査

死亡例を含む全例について下記器官を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液（精巣、精巣上体はブアン液で前固定）で固定し、保存した。

脳, 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 気管, 肺, 胃, 腸, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 精巣, 精巣上体, 前立腺, 精囊, 卵巣, 子宮, 脊髄 (頸部, 胸部, 腰部), 坐骨神経, 骨髓 (大腿骨), リンパ節 (頸部リンパ節, 腸間膜リンパ節), 乳腺, その他肉眼的異常部位

投与開始時に, 完全無作為抽出法により各群から雌雄それぞれ5匹を選び, 病理組織学検査は対照群および300mg/kg群のこれら雌雄各5匹, ならびに20mg/kg群で認められた死亡例について, 脳, 脊髄, 胃, 腸 (パイヤー板を含む), 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 心臓, 胸腺, 甲状腺 (上皮小体を含む), 気管, 肺, 子宮, 膀胱, 坐骨神経, 骨髓およびリンパ節 (頸部リンパ節, 腸間膜リンパ節) を検査した. 5, 20および80mg/kg群の雌雄各5匹については, 300mg/kg群で被験物質の投与による影響の認められた胃について検査した. さらに, 対照群および300mg/kgの全例, 妊娠不成立の雌雄および受胎後全胚の死亡が認められた雌については, 精巣, 精巣上体, 前立腺および精囊, あるいは卵巣を検査した. また, 非妊娠雌および受胎後全胚死亡の認められた雌では, 子宮および下垂体, 分娩時および哺育期間中に全児が死亡した雌では下垂体および乳腺も検査した. 検査は, 常法に従ってパラフィン切片を作製し, H-E 染色を施して鏡検した. また, 沈着物を同定するため, 一部の例の雌雄の脾臓について鉄 (ベルリンブルー) 染色, 雄の腎臓についてPAS染色も行った.

2) 新生児に関する項目

(1) 産児数, 性比および外表異常の観察

分娩完了の確認後, 各腹の産児数 (生産児と死亡児の合計) を調べ, 分娩率 (%) $[(\text{総出産児数} / \text{着床率}) \times 100]$ を, また肛門と生殖突起の長短により性別を判定し, 群ごとの性比を算出した. また, 新生児について, 口腔内を含む外表の異常を観察した.

(2) 一般状態観察

毎日, 一般状態および生死を確認し, 出生率 (%) $[(\text{出産確認時生児数} / \text{総出産児数}) \times 100]$ および哺育4日生存率 (%) $[(\text{哺育4日の生児数} / \text{出産確認時生児数}) \times 100]$ を算出した.

(3) 体重測定

新生児について、哺育0および4日に、雌雄別に各腹ごとの体重を測定し、1匹当たりの平均体重を算出した。

(4)病理学検査

死亡例はその都度、生存例は哺育4日にエーテル麻酔下で放血死させ、胸部および腹部における主要器官について、肉眼的に観察した。

5. 統計解析

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との有意差（危険率5%以下）を、次の方法で検定した。なお、出産児に関するデータは、1腹の平均を1標本とした。

体重、摂餌量、尿検査における定量的データ、血液学および血液生化学検査データ、器官重量、黄体数、着床数、妊娠期間、産児数、生児数、死亡児数等のパラメトリックデータについては、Bartlettの分散検定を行い、分散が一様な場合は一元配置の分散分析を行った。その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法（群間で標本数が異なる場合）により、対照群に対する各群の比較検定を行った。分散が一様でない場合、ならびに着床率、出生率、分娩率、新生児生存率、尿検査の定性的データ等のノンパラメトリックデータは、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett型またはScheffé型（群間で標本数が異なる場合）の検定により、対照群と各群の比較を行った。カテゴリカルデータは、交尾率、受胎率、出産率および児動物の性比については χ^2 検定、一般状態の観察および病理学検査における異常例の発現率についてはFisherの直接確率法を用いて検定した。

結 果

1. 反復投与毒性

1) 死亡 (Tables 1, 2, Appendices 8, 9)

20mg/kg群で、雄の1匹 (No. 026) が死亡した。この例は交配が成立せず、交配期間終了後も投与を続け、投与37日の投与直後に呼吸困難およびチアノーゼを伴って死亡したもので、剖検で肺の拡張および気管内の油状泡沫液、病理組織学検査で出血を伴った肺水腫が認められたことから、投与過誤による死亡と判断された。被験物質の毒性影響による死亡は、認められなかった。

2) 一般状態 (Tables 3, 4, Appendices 10, 11)

軽度の軟便が、投与11日から15日にかけて、80mg/kg群で雌雄の各1匹、300mg/kg群で雌雄の各3匹に認められた。また、被験物質の投与とは無関係に、対照群の雄の1匹に一過性の赤色尿、80mg/kg群の雄の1匹に右側頸胸部の脱毛、および300mg/kg群で分娩後全児の死亡が認められた雌の1匹に下腹部被毛の汚れが認められた。

3) 体重 (Figures 1, 2, Tables 5, 6, Appendices 12, 13)

被験物質投与各群の雌雄とも、体重および体重増加量に、有意な変化は認められなかった。

4) 摂餌量 (Figures 3, 4, Tables 7, 8, Appendices 14, 15)

被験物質の投与に起因する摂餌量の変化は認められなかった。投与46日において、20および300mg/kg群の雄の摂餌量は、対照群と比べて有意な低値を示したが、変化に用量相関性は認められず、むしろ対照群の摂餌量が他の測定日と比べてやや多く、偶発的と考えられる変化であった。

5) 雄の尿検査 (Table 9, Appendix 16)

被験物質投与各群とも、各検査項目に、有意な変化は認められなかった。

6) 血液学検査 (Tables 10, 11, Appendices 17, 18, 背景データ : Appendices 32, 33)

被験物質投与各群の雌雄とも、各検査項目に、有意な変化は認められなかった。

7) 血液生化学検査 (Tables 12, 13, Appendices 19, 20, 背景データ : Appendices 32, 33)

300mg/kg群で雄に、GPTの有意な増加およびトリグリセライドの有意な減少が認められた。雌には、変化は認められなかった。

8) 剖検 (Tables 14, 15, Appendices 21, 22)

被験物質の投与に起因する変化が、前胃に認められた。

妊娠を成立させた雄において、前胃の粘膜肥厚が、80mg/kg群で10匹中6匹、300mg/kg群で10匹中10匹に認められた。なお、肝臓の横隔膜結節が認められたが、5mg/kg群の10匹中1匹のみの変化であった。分娩し、哺育も順調であった雌においても、前胃の粘膜肥厚が、80mg/kg群で10匹中9匹、300mg/kg群で9匹中9匹に認められた。

一方、対照群に認められた妊娠不成立の3対においては、3対の雄の全例に精巢の小型化が認められた。20mg/kg群に認められた交配不成立の1対では、交配期間の後死亡した雄に前述の投与過誤による肺および気管の変化が認められた以外、変化は認められなかった。受胎後胚死亡の認められた5mg/kg群の雌の2匹中1匹には、子宮の緑色液貯留が認められた。分娩後全児が死亡した300mg/kg群の雌の1匹には、前胃の粘膜肥厚は認められたが、その他の変化は、認められなかった。

以上の変化のうち、80および300mg/kg群の雌雄の前胃粘膜肥厚の発現率は、対照群と比べて有意差が認められた。

9) 器官重量 (Tables 16, 17, Appendices 23~26)

被験物質投与各群の雌雄とも、各器官の絶対および相対重量に、有意な変化は認められなかった。

10) 病理組織学検査 (Tables 18, 19, Appendices 21, 22, Photos 1, 2)

(1) 生殖器系以外の器官

被験物質の投与に起因する変化が、前胃に認められた。

各群の雌雄各5匹の検査において、前胃に角化亢進を伴う重層偏平上皮の過形成が、80mg/kg群で4匹、300mg/kg群で5匹に認められ、変化の程度も、用量依存的に増強する傾向が認められた。また、これらの多くの例では、上皮の過形成の程度と概ね相関した、粘膜固有層および粘膜下織の軽度から重度な浮腫を伴っていた。さらに、粘膜固有層から粘膜下織にかけての好中球を主とする炎症性細胞浸潤が、80mg/kg群で雌の1匹、300mg/kg群で雄の4匹および雌の2匹に認められ、これらの例のうち、300mg/kg群の雄の3匹および雌の1匹には、びらんが確認された。以上の変化のうち、80および300mg/kg群の雌雄の重層偏平上皮の過形成、300mg/kg群の雌雄の粘膜固有層・粘膜下織の浮腫、および雄の粘膜固有層・粘膜下織の炎症性細胞浸潤の発現率には、対照群と比べて有意差が認められた。

被験物質の投与とは無関係な変化として、対照群および300mg/kg群の雌雄あるいはそのいずれかに、肺の泡沫細胞集簇、類骨異所形成および動脈鉍質沈着、心臓の心筋変性・線維化、肝臓の微小肉芽腫および肝細胞脂肪変性、腎臓の嚢胞形成、硝子円柱、リンパ球浸潤、近位尿細管上皮空胞変性、好塩基性尿細管および線維化、胸腺の出血および皮質萎縮、副腎の皮質出血が認められたが、軽度、かつ、散発的な変化であった。また、脾臓の髄外造血およびヘモジリン沈着が雌雄の全例、腎臓の近位尿細管上皮硝子滴が雄の全例に認められたが、対照群と比べて変化の程度に差は認められなかった。

(2) 生殖器系器官

被験物質の投与に起因する変化は、認められなかった。妊娠を成立させた対照群および300mg/kg群の雄において、精巣上体の精子肉芽腫が300mg/kg群で10匹中2匹、前立腺の間質リンパ球浸潤が対照群で7匹中2匹、300mg/kg群で10匹中5匹に認められた。精巣および精嚢には、変化は認められなかった。分娩し、哺育も順調であった対照群および300mg/kg群の雌の卵巣においては、変化は認められなかった。

一方、対照群に認められた妊娠不成立の3対では、雄の3匹に共通して、精巣の間質細胞の軽度な過形成を伴った中等度ないし重度な精細管萎縮、および精巣上体の精巣上

体管内精子の中等度ないし重度な減少が認められた。5 mg/kg群で全胚死亡の認められた2匹の雌のうち、1匹には子宮の内膜過形成および内腔拡張が認められ、他の1匹には生殖器系器官および下垂体に変化は認められなかった。20mg/kg群で認められた交配不成立の1対では、雌雄の生殖器系器官および雌の下垂体に、変化は認められなかった。300mg/kg群で分娩後全児死亡の認められた1匹の雌では、卵巢、下垂体および乳腺に変化は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響 (Table 20, Appendices 27, 28)

(1) 性周期検査

被験物質投与各群の発情周期は、対照群と比べて有意差は認められなかった。

(2) 交尾率および受胎率

交尾は20mg/kg群の1対を除いて全例に成立し、成立に要する期間にも、有意な差は認められなかった。受胎率も、対照群は精子形成異常の認められた雄3匹の対で受胎しなかったため、受胎率が70%であったが、被験物質投与の各群では100%であった。

(3) 黄体数、着床数および着床率

被験物質投与各群の黄体数、着床数および着床率は、対照群と比べて有意差は認められなかった。

(4) 出産率および妊娠期間

出産率は、対照群の100%に対して5 mg/kg群では80%であったが、有意な差ではなかった。また、20, 80および300mg/kg群の出産率は、100%であった。被験物質投与各群の妊娠期間にも、対照群と比べて有意差は認められなかった。

(5) 分娩および哺育状態

300mg/kg群の1匹が難産で、分娩予定日の夕方に膣出血が認められたが分娩は認めら

れず、翌朝になって14匹の出産児が確認され、分娩は完了した。この例では、出産児のうち12匹は死亡しており、2匹の新生児に対しても雌親は哺育行動をとらず、1匹は哺育0日に死亡し、他の1匹も哺育2日の朝に存在が確認できず、捕食されたものと判断された。この1例を除いて、分娩および哺育状態に異常は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 21, Appendices 29)

被験物質投与各群の1腹当たりの総出産児数、分娩率、新生児数、出生率、性比、哺育0日の体重、ならびに哺育4日の生存率および体重には、いずれも対照群と比べて、有意差は認められず、新生児の一般状態にも異常は認められなかった。なお、300mg/kg群の新生児数および出生率は、前述の出産確認時に出産児のほとんどが死亡していた1匹を含むため、他の群に比べてやや低値を示したが、統計学的に有意な変化ではなかった。

(2) 形態 (Tables 22, 23, Appendices 30, 31)

外表および内臓異常は、いずれの児動物にも認められなかった。内臓変異についても、胸腺の頸部遺残、左臍動脈遺残および腎盂の拡張が少数例に認められたが、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

考 察

1. 反復投与毒性について

雌雄の親動物とも、主な毒性として、前胃に変化が認められた。すなわち、80mg/kg以上の群の雌雄に、剖検では前胃粘膜の肥厚、病理組織学的には重層扁平上皮の過形成、びらん、ならびに粘膜固有層および粘膜下組織における浮腫や炎症性細胞浸潤として認められた。一般に、アニオン系界面活性剤は他の界面活性剤と同様に局所刺激性を有し⁷⁻⁹⁾、本被験物質についても、ラットへの反復経皮投与により、局所刺激性反応が認められている⁵⁾。したがって、本試験で認められた前胃の変化は、局所的な傷害による炎症および上皮の反応性増殖と解せられる。

また、アニオン系界面活性剤のラットへの経口投与により、下痢の発現することが知られている^{10, 11)}。本試験においても、80および300mg/kg群の雌雄の一部の例に、軟便が認められたが、一過性の軽度な変化で、腸には病理組織学的変化は認められず、体重にも変化が認められなかった。したがって、本試験で認められた軟便は、有害性の観点からは、ほとんど問題にならない変化と判断される。

以上の変化に加えて、300mg/kg群で雄に、血清GPTの増加およびトリグリセライドの減少が認められた。

GPTの増加については、軽度な変化であったが本系ラットの背景データにおける正常範囲（Appendix 32 参照）をやや上回る異常値であり、また投与量設定試験においても同様の変化が認められていることから、被験物質の投与に起因する変化と判断される。しかしながら、肝臓には病理組織学的変化は認められず、他に関連する変化も認められなかった。

一方、トリグリセライドの変化については、本被験物質の界面活性剤としての性質と関連して、脂質の吸収に影響する可能性が考えられるものの、変化は背景データにおける正常範囲内（Appendix 32 参照）のごく軽度なもので、毒性学的意義は小さいものと考えられる。

アニオン系界面活性剤の反復経口投与毒性について、アルキルベンゼンスルホン酸塩¹¹⁾、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩^{12, 13)}、 α -オレフィンスルホン酸塩¹⁴⁾、アルキル硫酸エステル塩^{12, 15)}等についての多くの報告がみられる。これらの報

告を通じて、アニオン系界面活性剤の毒性は一般に弱く、局所刺激性による消化管障害を除いて、特定の臓器に対する重篤な毒性影響は認められていない。

今回のアルファスルホ脂肪酸エステル塩に属するアニオン系界面活性剤である、1-メトキシカルボニルペンタデカンスルホン酸ナトリウムのラットへの反復投与においても、認められた主な毒性は前胃の変化であった。また、軽度の血液生化学的影響も認められた。無影響量は、雌雄とも 20mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性について

雄親および雌親の生殖能に対する影響について、観察した各指標とも、対照群と比べて有意な変化は認められず、雌雄の生殖器官にも病理学的変化は認められなかった。また、児動物の発生に関する各指標においても、被験物質の投与による影響は認められなかった。

なお、対照群に認められた妊娠不成立の3対については、いずれも雄の精巣における精子形成異常によることが確認された。被験物質投与群で認められた5 mg/kg群の全胚死亡の2匹、20mg/kg群の交配不成立の1対、300mg/kg群のおそらく難産による分娩時および分娩後全児死亡の1匹については、散発的な発現で生殖器系器官に被験物質の投与に起因する病理学的変化が認められなかったことから、偶発的なものと判断された。

本被験物質以外のアニオン系界面活性剤の生殖発生毒性に関して、多くの報告¹⁶⁻¹⁸⁾がみられるが、催奇形性を含む問題となる毒性は認められていない。

今回の1-メトキシカルボニルペンタデカンスルホン酸ナトリウムのラットへの投与においても、生殖発生毒性は認められなかった。したがって、雌雄親動物の生殖能および児動物の発生に対する無影響量は、300mg/kg/day以上と推定された。

文 献

- 1) : 厚生省環境衛生局食品化学課編集 : 「洗剤の毒性とその評価」, 社団法人日本食品衛生協会, 1983.
- 2) : α -SFのラットにおける急性経口毒性試験, ライオン生物学研究所, 社内資料, 1990.
- 3) : α -スルホ脂肪酸メチルエステルナトリウム塩のラットにおける28日間経皮投与毒性試験, ライオン生物学研究所, 社内資料, 1990.
- 4) : α -スルホ脂肪酸メチルエステルナトリウム塩のラット経皮投与による催奇形性試験, ライオン生物学研究所, 社内資料, 1990.
- 5) : α -スルホ脂肪酸メチルエステルナトリウム塩の微生物を用いる復帰突然変異試験, ライオン生物学研究所, 社内資料, 1990.
- 6) : α -SFの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験, ライオン生物科学研究所, 社内資料, 1997.
- 7) : Brown, V.K.H., A comparison of predictive irritation tests with surfactants on human and animal skin, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 22, 411-420, 1971.
- 8) : Imokawa, G., Study on skin-irritating and biological properties of monoalkyl phosphate anionic surfactants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 604-609, 1979.
- 9) : Nixon, G.A., Tyson, C.A. and Wertz, W.C., Interspecies comparison of skin irritancy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31, 481-490, 1975.
- 10) : アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムの毒性に関する研究, 環境科学特別研究報告, 合成洗剤の生物影響 (文部省環境科学特別研究検討班 S-510), 81-90, 1981.
- 11) : Ryuta, I., et al., Acute, subacute and chronic toxicity of magnesium linear alkylbenzene sulfonate (LAS-Mg), *J. Med. Soc. Toho, Japan*, 25, 850-875, 1978.
- 12) : Walker, A.I.T., et al., Toxicity of sodium lauryl sulfate, sodium lauryl

- ethoxysulfate and corresponding surfactants derived from synthetic alcohols, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 5, 763-769, 1967.
- 13) : Tusing, T.W., Paynter, O.E., Oppdyke, D.L. and Snyder, F.H., Toxicologic studies on sodium lauryl glyceryl ether sulfonate and sodium lauryl trioxyethylene sulfate, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 4, 402-409, 1962.
- 14) : 薬効開発研究会研究所, AOS-Mgのラットにおける経口, 経皮6か月慢性毒性, 薬効開発研究会研究所報告, 1980.
- 15) : Smyth, H.F.Jr., Carpenter, C.P., Weil, C.S. and King, J.M., Experimental toxicity of sodium 2-ethylhexyl sulfate, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17, 53-59, 1970.
- 16) : Buehler, E.V., Newman, E.A. and King, W.R., Two-year feeding and reproduction study in rats with linear alkylbenzene sulphonate (LAS), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 18, 83-91, 1971.
- 17) : Nolen, G.A., Klusman, L.W., Patrick, L.F. and Geil R.G., Teratology studies of a mixture of tallow alkyl ethoxylate and linear alkylbenzene sulphonate in rats and rabbits, *Toxicology*, 4, 231-243, 1975.
- 18) : Palmer, A.K., Readshaw, M.A. and Neuff, A.M., Assessment of the teratogenic potential of surfactants. Part II-AOS, *Toxicology*, 3, 107-113, 1975.

1-メトキシカルボニルペンタデカンスルホン酸ナトリウムの
ラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

(試験番号：99-173)

最終報告書 添付資料A

(図・群別平均値表)

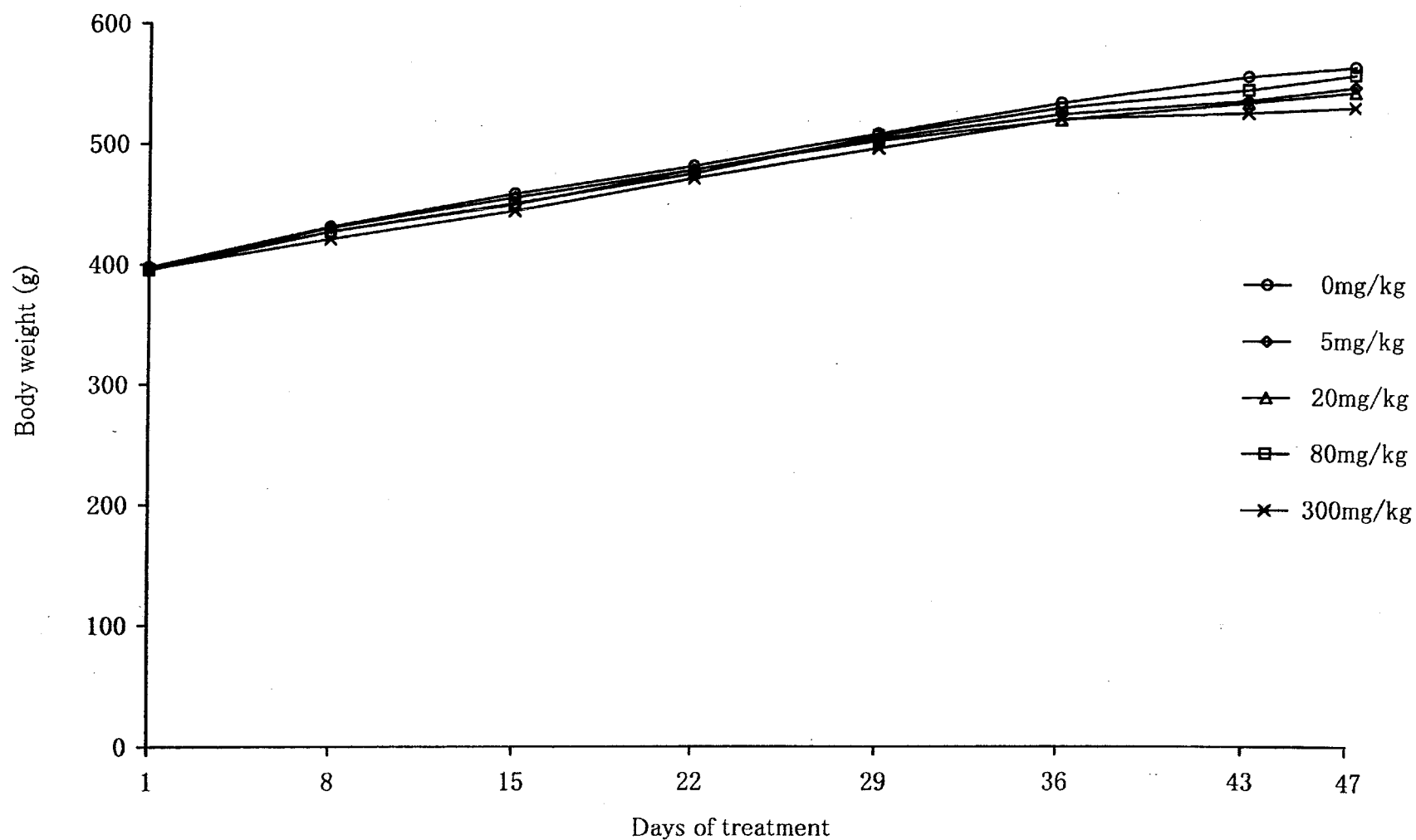


Fig. 1 Body weight change in male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

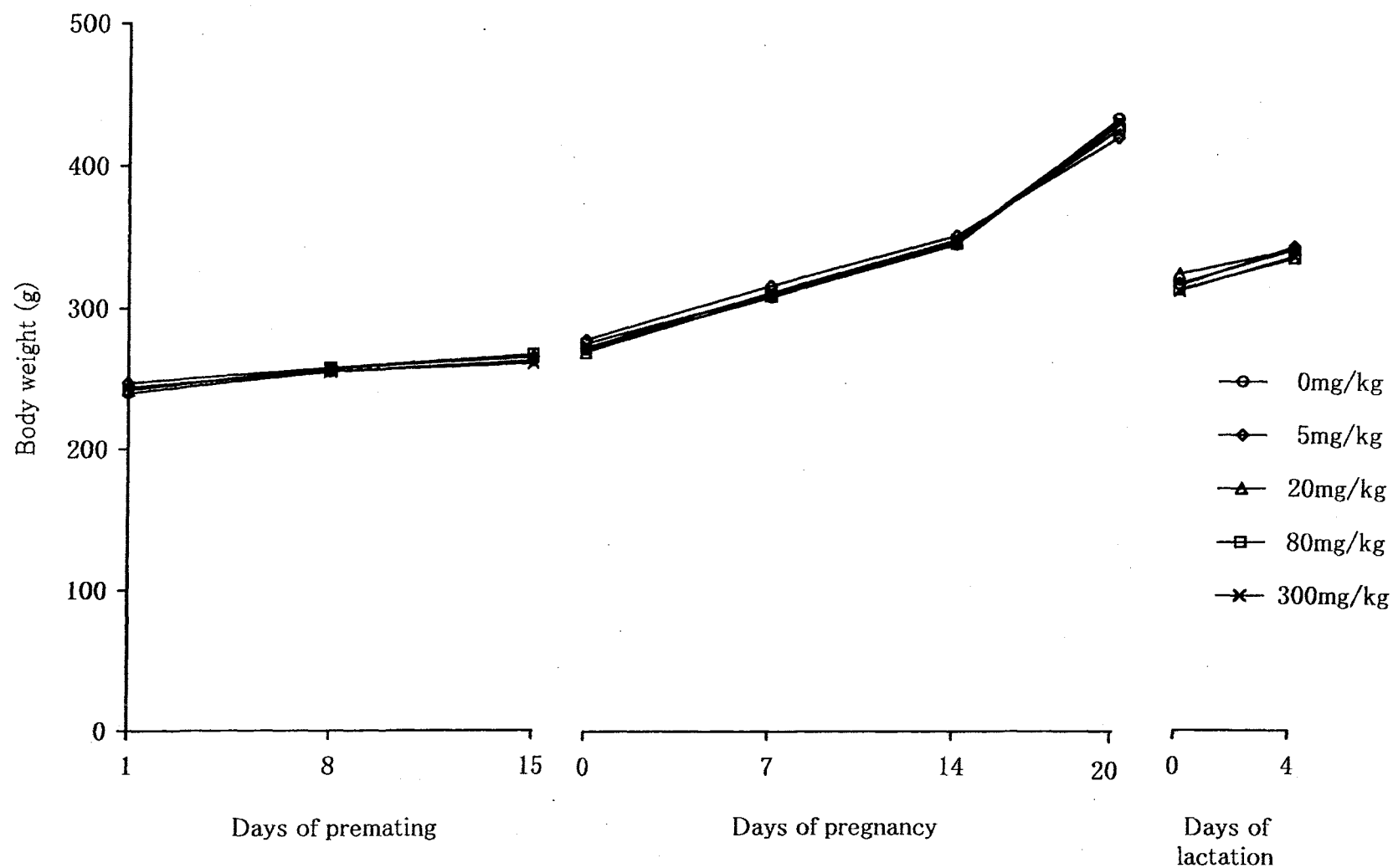


Fig. 2 Body weight change in female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

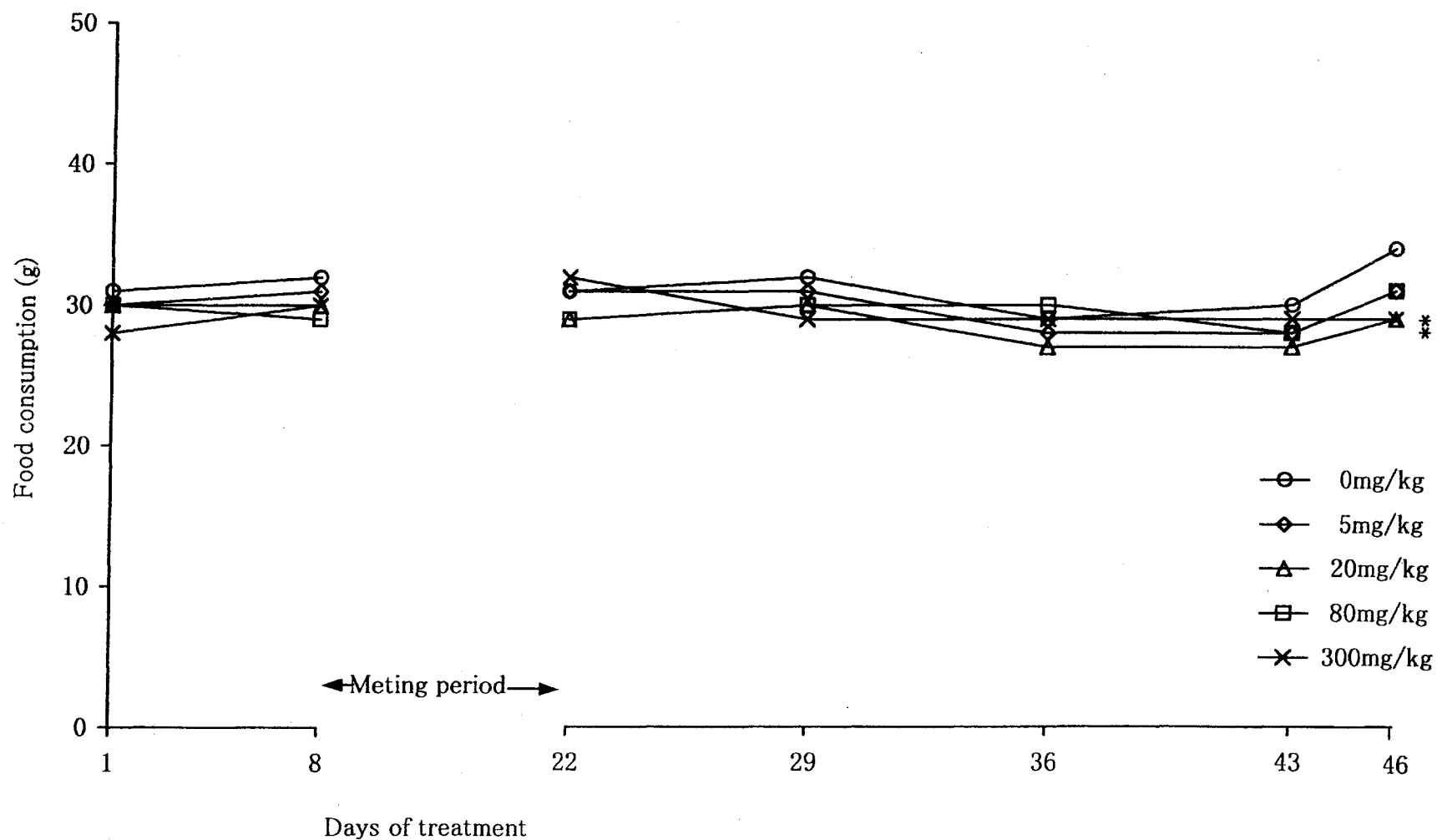


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significantly different from control (* : $p < 0.05$)

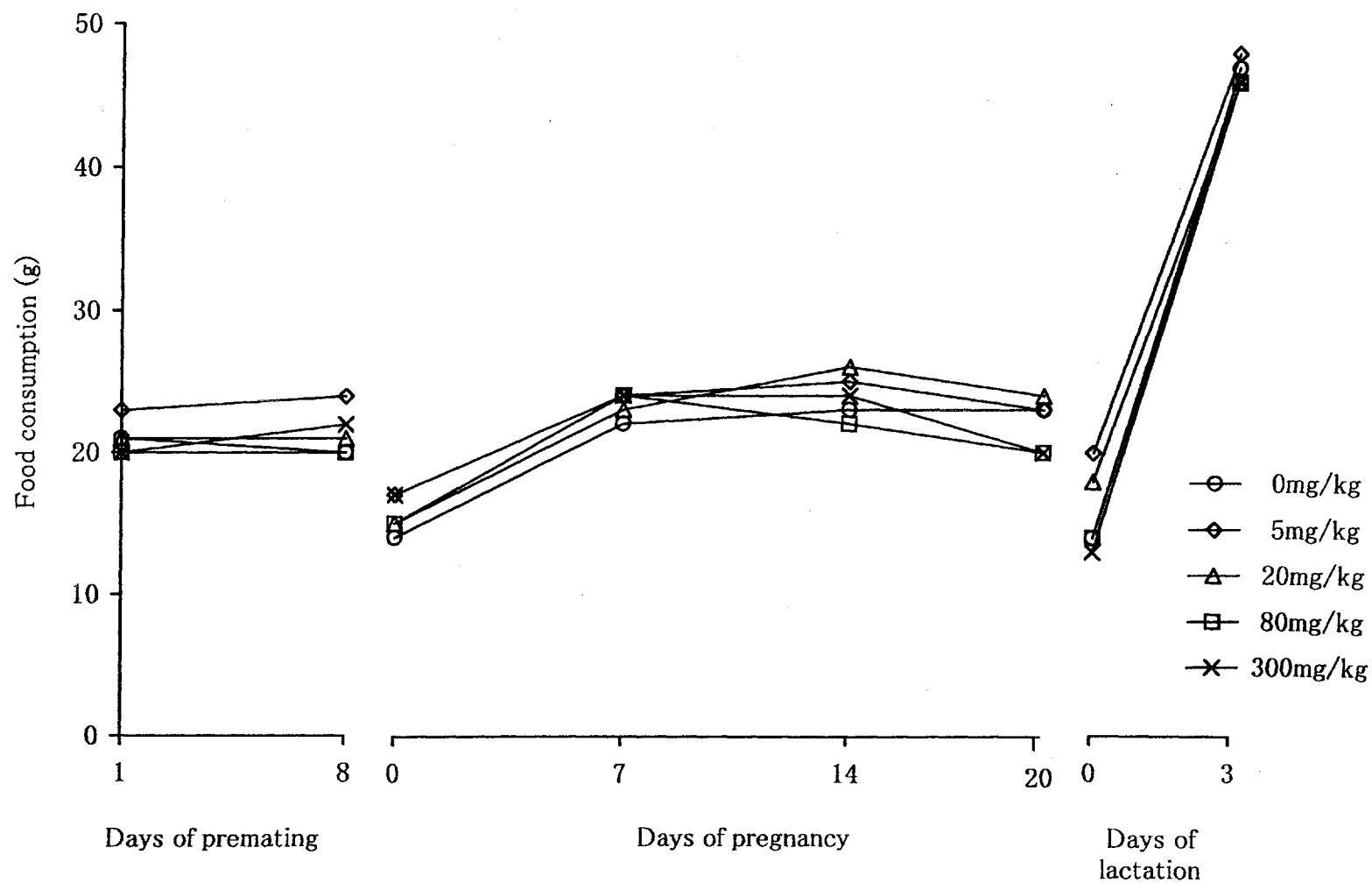


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Mortality rate of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	5	20	80	300
No. of animals examined	10	10	10	10	10
No. of animals that died	0	0	1 ^a	0	0
Mortality (%)	0	0	10	0	0

a : Died of technical error

Table 2 Mortality rate of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	5	20	80	300
No. of animals examined	10	10	10	10	10
No. of animals that died	0	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0	0

Table 3 Incidence of clinical signs of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose (mg/kg)	0			5	20			80	300
		TK	FP	(Total)	TK	TK	TE	(Total)	TK	TK
	No. of animals	7	3	(10)	10	9	1	(10)	10	10
Reddish urine	-	6	3	(9)	10	9	1	(10)	10	10
	+	1	0	(1)	0	0	0	(0)	0	0
Loose stool	-	7	3	(10)	10	9	1	(10)	9	7
	+	0	0	(0)	0	0	0	(0)	1	3
Alopeica	-	7	3	(10)	10	9	1	(10)	9	10
	+	0	0	(0)	0	0	0	(0)	1	0

TK : Terminal kill
 FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination
 TE : Died of technical error
 - : Negative
 + : Slight

Table 4 Incidence of clinical signs of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose (mg/kg)	0			5			20			80	300		
		TK	NP	(Total)	TK	ED	(Total)	TK	UC	(Total)	TK	TK	KL	(Total)
	No. of animals	7	3	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	10	9	1	(10)
Loose stool	-	7	3	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	9	7	0	(7)
	+	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	1	2	1	(3)
Soiled perineal region	-	7	3	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	10	9	0	(9)
	+	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	1	(1)

TK : Terminal kill on day 5 after perturbation

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation

ED : Animal with embryonic death, killed at the termination

UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination of mating period

KL : Killed because all pups died after delivery

- : Negative

+: Slight

Table 5

Body weights of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of treatment								Gain 1~47
	1	8	15	22	29	36	43	47	
0	398 ± 12 (10)	431 ± 21 (10)	458 ± 27 (10)	481 ± 31 (10)	508 ± 32 (10)	533 ± 34 (10)	555 ± 32 (10)	563 ± 33 (10)	165 ± 24 (10)
5	397 ± 14 (10)	430 ± 17 (10)	455 ± 17 (10)	478 ± 18 (10)	504 ± 22 (10)	524 ± 21 (10)	535 ± 23 (10)	546 ± 24 (10)	149 ± 24 (10)
20	397 ± 11 (10)	427 ± 17 (10)	449 ± 23 (10)	478 ± 22 (10)	502 ± 24 (10)	519 ± 31 (10)	533 ± 33 (9)	542 ± 33 (9)	144 ± 31 (9)
80	395 ± 12 (10)	427 ± 18 (10)	450 ± 24 (10)	475 ± 20 (10)	506 ± 22 (10)	529 ± 27 (10)	544 ± 33 (10)	556 ± 34 (10)	161 ± 26 (10)
300	396 ± 12 (10)	421 ± 12 (10)	444 ± 14 (10)	471 ± 17 (10)	496 ± 21 (10)	520 ± 25 (10)	525 ± 29 (10)	529 ± 30 (10)	133 ± 26 (10)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

Table 6

Body weights of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of pre-mating				Days of pregnancy					Days of lactation		
	1	8	15	Gain 1~15	0	7	14	20	Gain 0~20	0	4	Gain 0~4
0	240 ± 13 (10)	255 ± 15 (10)	263 ± 17 (10)	23 ± 10 (10)	270 ± 18 (7)	307 ± 20 (7)	344 ± 25 (7)	431 ± 32 (7)	161 ± 21 (7)	315 ± 33 (7)	339 ± 28 (7)	24 ± 17 (7)
5	247 ± 12 (10)	258 ± 18 (10)	265 ± 18 (10)	18 ± 11 (10)	277 ± 30 (10)	315 ± 30 (10)	350 ± 28 (10)	418 ± 46 (10)	140 ± 44 (10)	314 ± 31 (8)	341 ± 27 (8)	27 ± 17 (8)
20	242 ± 10 (10)	257 ± 15 (10)	266 ± 19 (10)	24 ± 13 (10)	268 ± 15 (9)	308 ± 21 (9)	345 ± 24 (9)	427 ± 35 (9)	159 ± 25 (9)	322 ± 25 (9)	339 ± 23 (9)	17 ± 9 (9)
80	242 ± 12 (10)	258 ± 12 (10)	267 ± 16 (10)	25 ± 6 (10)	274 ± 15 (10)	309 ± 24 (10)	346 ± 26 (10)	424 ± 38 (10)	151 ± 32 (10)	311 ± 31 (10)	333 ± 30 (10)	22 ± 21 (10)
300	244 ± 12 (10)	255 ± 12 (10)	261 ± 15 (10)	18 ± 10 (10)	271 ± 15 (10)	310 ± 17 (10)	347 ± 19 (10)	429 ± 25 (10)	158 ± 12 (10)	310 ± 21 (10)	334 ± 29 (9)	23 ± 12 (9)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

Table 7 Food consumption of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Days of treatment						
	1	8	22	29	36	43	46
0	31 ± 3 (10)	32 ± 4 (10)	31 ± 3 (10)	32 ± 2 (10)	29 ± 5 (10)	30 ± 2 (10)	34 ± 3 (10)
5	30 ± 3 (10)	31 ± 3 (10)	31 ± 2 (9)	31 ± 2 (10)	28 ± 4 (10)	28 ± 2 (10)	31 ± 3 (10)
20	30 ± 4 (10)	30 ± 3 (10)	29 ± 3 (9)	30 ± 4 (10)	27 ± 4 (10)	27 ± 4 (9)	29* ± 3 (9)
80	30 ± 2 (10)	29 ± 3 (10)	29 ± 3 (10)	30 ± 3 (10)	30 ± 3 (10)	28 ± 3 (10)	31 ± 4 (10)
300	28 ± 3 (10)	30 ± 3 (10)	32 ± 3 (10)	29 ± 4 (10)	29 ± 3 (10)	29 ± 4 (10)	29* ± 3 (10)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 8 Food consumption of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	(g/rat/day)							
	Days of pre-mating		Days of pregnancy				Days of lactation	
	1	8	0	7	14	20	0	3
0	21 ± 3 (10)	20 ± 4 (10)	14 ± 3 (7)	22 ± 3 (7)	23 ± 3 (7)	23 ± 4 (7)	14 ± 9 (7)	47 ± 5 (7)
5	23 ± 2 (10)	24 ± 3 (10)	17 ± 3 (10)	24 ± 3 (10)	25 ± 4 (10)	23 ± 6 (10)	20 ± 6 (8)	48 ± 3 (8)
20	21 ± 3 (10)	21 ± 3 (10)	15 ± 3 (9)	23 ± 3 (9)	26 ± 3 (9)	24 ± 5 (9)	18 ± 5 (9)	46 ± 8 (9)
80	20 ± 3 (10)	20 ± 3 (10)	15 ± 3 (10)	24 ± 3 (10)	22 ± 5 (10)	20 ± 7 (10)	14 ± 7 (10)	46 ± 5 (10)
300	20 ± 3 (10)	22 ± 3 (10)	17 ± 2 (10)	24 ± 2 (10)	24 ± 2 (10)	20 ± 4 (10)	13 ± 8 (10)	46 ± 9 (9)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

Table 9 - 1

Urinary findings of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	Color			Cloudy		Specific gravity	pH							Protein				
		PY	PB	Y	-	+		5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++	+++
0	10	9		1	10		1.051 ^{a)} ± 0.013			1			3	6			6	4	
5	10	10			10		1.045 ± 0.015						2	8			9	1	
20	9	8	1		9		1.065 ± 0.018			1			1	7			5	4	
80	10	8	1	1	10		1.062 ± 0.017				1	1	2	6			6	4	
300	10	10			10		1.068 ± 0.019		1	1			2	6			3	7	

Dose (mg/kg)	No. of animals	Glucose				Ketone body					Occult blood					Urobilinogen				Bilirubin		
		-	±	+	++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	0.1	1	2	4	-	+	++
0	10	10				1	7	2			10					10				10		
5	10	10				3	6	1			10					10				10		
20	9	9					3	6			9					9				9		
80	10	10				2	1	7			10					10				10		
300	10	10					3	7			10					10				10		

a) : Mean±S.D.

Color : PY(pale yellow), PB(pale brown), Y(yellow)

Cloudy : -(negligible), +(cloudy)

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dL), +(30mg/dL), ++(100mg/dL), +++(300mg/dL)

Glucose : -(negligible), ±(0.1g/dL), +(0.25g/dL), ++(0.5g/dL)

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dL), +(15mg/dL), ++(40mg/dL), +++(80mg/dL)

Occult blood : -(negligible), ±(trace), +(slight), ++(moderate), +++(marked)

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL

Bilirubin : -(negligible), +(slight), ++(moderate)

Table 9 - 2

Urinary findings of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes				Leukocytes				Crystals											
										M g				C a				Ams			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
0	10	10				10				5	1	3	1	10				10			
5	10	10				10				7	2	1		10				10			
20	9	9				9				5	2	1	1	9				9			
80	10	10				10				3	5	1	1	10				10			
300	10	10				10				4	3	3		10				10			

Dose (mg/kg)	No. of animals	Epithelial cells										Casts						Fat globules		
		Sq				R			S			G		H		W				
		-	+	++	+++	-	+	++	-	+	++	-	+	-	+	-	+	-	+	++
0	10	1	9			10			10			10		10		10		10		
5	10	1	9			10			10			10		10		10		10		
20	9	1	8			9			9			9		9		9		9		
80	10	3	7			10			10			10		10		10		10		
300	10	3	7			10			10			10		10		10		10		

- : Not observed; + : A few in some fields; ++ : A few in all fields; +++ : Many in all fields

Crystals

Mg(ammonium magnesium phosphate)

Ca(calcium carbonate)

Ams(amorphous)

Epithelial cells

Sq(squamous)

R(round)

S(spindle)

Casts

G(granule)

H(hyaline)

W(waxy)

Table 10 Hematological findings of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC (10 ⁴ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)	APTT (sec)
0	10	874 ± 41	16.1 ± 0.6	46.7 ± 1.6	54 ± 1	18.5 ± 0.7	34.6 ± 0.7	22 ± 4	13.2 ± 0.5	20.7 ± 1.6
5	10	870 ± 31	15.5 ± 0.6	45.3 ± 1.8	52 ± 1	17.9 ± 0.3	34.4 ± 0.7	20 ± 5	13.4 ± 0.4	21.2 ± 0.9
20	9	874 ± 42	15.9 ± 0.6	46.6 ± 2.1	53 ± 2	18.2 ± 0.5	34.2 ± 0.9	20 ± 4	13.4 ± 0.6	22.3 ± 2.3
80	10	859 ± 22	15.7 ± 0.5	45.7 ± 1.1	53 ± 1	18.3 ± 0.5	34.4 ± 0.5	21 ± 5	13.2 ± 0.4	20.3 ± 1.1
300	10	861 ± 27	16.0 ± 0.3	46.4 ± 1.0	54 ± 2	18.6 ± 0.4	34.5 ± 0.3	22 ± 7	13.6 ± 0.7	20.0 ± 1.5
Differential leukocyte counts (%)										
Dose (mg/kg)	No. of animals	WBC (10 ² /μL)	Neutro.							Plat. (10 ⁴ /μL)
			Baso.	Eosin.	Stab.	Seg.	Lymph.	Mono.	Other	
0	10	73 ± 14	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0	16 ± 6	80 ± 5	3 ± 2	0 ± 0	133 ± 21
5	10	72 ± 22	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	15 ± 8	83 ± 8	1 ± 1	0 ± 0	127 ± 14
20	9	64 ± 12	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	15 ± 4	82 ± 4	2 ± 1	0 ± 0	133 ± 15
80	10	63 ± 13	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	16 ± 8	81 ± 9	2 ± 1	0 ± 0	133 ± 24
300	10	71 ± 18	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	18 ± 4	79 ± 5	2 ± 1	0 ± 0	128 ± 13

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

Table 11 Hematological findings of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)	APTT (sec)
0	7	676 $\pm$ 48	13.2 $\pm$ 1.0	38.5 $\pm$ 2.9	57 $\pm$ 2	19.5 $\pm$ 0.6	34.2 $\pm$ 0.6	47 $\pm$ 9	13.2 $\pm$ 0.4	18.6 $\pm$ 0.9
5	8	684 $\pm$ 32	13.1 $\pm$ 0.5	38.6 $\pm$ 1.5	57 $\pm$ 2	19.1 $\pm$ 0.5	33.8 $\pm$ 0.4	55 $\pm$ 16	13.1 $\pm$ 0.4	19.0 $\pm$ 1.4
20	9	690 $\pm$ 43	13.3 $\pm$ 0.9	39.1 $\pm$ 2.6	57 $\pm$ 1	19.3 $\pm$ 0.6	34.0 $\pm$ 0.7	47 $\pm$ 15	13.3 $\pm$ 0.4	18.5 $\pm$ 1.8
80	10	665 $\pm$ 38	12.6 $\pm$ 0.7	37.0 $\pm$ 1.9	56 $\pm$ 2	19.0 $\pm$ 0.8	34.0 $\pm$ 0.6	47 $\pm$ 17	13.1 $\pm$ 0.3	17.8 $\pm$ 1.7
300	9	677 $\pm$ 25	13.0 $\pm$ 0.4	38.4 $\pm$ 1.3	57 $\pm$ 2	19.2 $\pm$ 0.7	33.9 $\pm$ 0.5	51 $\pm$ 19	13.2 $\pm$ 0.4	17.8 $\pm$ 0.9
Differential leukocyte counts (%)										
Dose (mg/kg)	No. of animals	WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	Neutro.							Plat. ($10^4/\mu\text{L}$)
			Baso.	Eosin.	Stab.	Seg.	Lymph.	Mono.	Other	
0	7	70 $\pm$ 11	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	25 $\pm$ 7	74 $\pm$ 7	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	141 $\pm$ 25
5	8	74 $\pm$ 13	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	32 $\pm$ 11	67 $\pm$ 11	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	164 $\pm$ 21
20	9	78 $\pm$ 18	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	27 $\pm$ 9	71 $\pm$ 9	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	149 $\pm$ 22
80	10	75 $\pm$ 14	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	38 $\pm$ 14	61 $\pm$ 13	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	144 $\pm$ 19
300	9	82 $\pm$ 20	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	29 $\pm$ 12	69 $\pm$ 13	1 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	142 $\pm$ 19

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

Table 12 Blood biochemical findings of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	LDH (IU/L)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Cho. (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
0	10	321 $\pm$ 189	74 $\pm$ 11	41 $\pm$ 4	396 $\pm$ 106	0.60 $\pm$ 0.14	6.17 $\pm$ 0.24	2.97 $\pm$ 0.10	0.93 $\pm$ 0.05	66 $\pm$ 17	63 $\pm$ 28
5	10	330 $\pm$ 161	74 $\pm$ 11	40 $\pm$ 6	506 $\pm$ 129	0.50 $\pm$ 0.16	6.12 $\pm$ 0.20	2.99 $\pm$ 0.13	0.96 $\pm$ 0.07	51 $\pm$ 5	43 $\pm$ 18
20	9	322 $\pm$ 133	72 $\pm$ 8	38 $\pm$ 3	435 $\pm$ 74	0.51 $\pm$ 0.25	6.13 $\pm$ 0.20	2.99 $\pm$ 0.17	0.95 $\pm$ 0.08	60 $\pm$ 9	50 $\pm$ 22
80	10	278 $\pm$ 81	75 $\pm$ 7	44 $\pm$ 6	442 $\pm$ 64	0.66 $\pm$ 0.32	6.01 $\pm$ 0.24	2.98 $\pm$ 0.17	0.99 $\pm$ 0.15	64 $\pm$ 14	49 $\pm$ 18
300	10	278 $\pm$ 126	78 $\pm$ 11	53** $\pm$ 7	461 $\pm$ 105	0.65 $\pm$ 0.21	5.94 $\pm$ 0.25	3.04 $\pm$ 0.14	1.05 $\pm$ 0.08	53 $\pm$ 10	29* $\pm$ 13
Dose (mg/kg)	No. of animals	Glu. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0	10	131 $\pm$ 14	10.7 $\pm$ 1.5	0.57 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.02	9.6 $\pm$ 0.3	6.8 $\pm$ 0.6	144 $\pm$ 1	4.49 $\pm$ 0.36	106 $\pm$ 1	
5	10	128 $\pm$ 10	11.1 $\pm$ 1.6	0.58 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.03	9.6 $\pm$ 0.3	6.8 $\pm$ 0.5	145 $\pm$ 1	4.46 $\pm$ 0.20	106 $\pm$ 2	
20	9	123 $\pm$ 13	11.4 $\pm$ 1.3	0.56 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.02	9.5 $\pm$ 0.2	6.8 $\pm$ 0.5	146 $\pm$ 1	4.64 $\pm$ 0.34	106 $\pm$ 1	
80	10	129 $\pm$ 9	11.7 $\pm$ 1.4	0.58 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.01	9.4 $\pm$ 0.3	6.7 $\pm$ 0.7	145 $\pm$ 1	4.49 $\pm$ 0.34	107 $\pm$ 1	
300	10	126 $\pm$ 15	11.1 $\pm$ 1.5	0.58 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.02	9.4 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.7	145 $\pm$ 1	4.51 $\pm$ 0.34	106 $\pm$ 1	

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 13 Blood biochemical findings of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	LDH (IU/L)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Cho. (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
0	7	440 $\pm$ 184	102 $\pm$ 20	64 $\pm$ 14	287 $\pm$ 78	0.72 $\pm$ 0.27	5.80 $\pm$ 0.18	2.88 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.06	83 $\pm$ 20	65 $\pm$ 24
5	8	408 $\pm$ 132	104 $\pm$ 20	68 $\pm$ 18	281 $\pm$ 124	0.56 $\pm$ 0.41	5.91 $\pm$ 0.29	3.00 $\pm$ 0.17	1.03 $\pm$ 0.06	69 $\pm$ 11	53 $\pm$ 15
20	9	390 $\pm$ 199	97 $\pm$ 21	64 $\pm$ 21	273 $\pm$ 84	0.65 $\pm$ 0.31	5.71 $\pm$ 0.23	2.97 $\pm$ 0.12	1.10 $\pm$ 0.11	72 $\pm$ 9	63 $\pm$ 22
80	10	345 $\pm$ 115	124 $\pm$ 30	87 $\pm$ 24	317 $\pm$ 109	0.73 $\pm$ 0.28	5.81 $\pm$ 0.19	2.95 $\pm$ 0.11	1.04 $\pm$ 0.07	75 $\pm$ 14	60 $\pm$ 12
300	9	446 $\pm$ 174	99 $\pm$ 17	67 $\pm$ 12	243 $\pm$ 57	0.49 $\pm$ 0.17	5.65 $\pm$ 0.25	2.91 $\pm$ 0.17	1.07 $\pm$ 0.11	66 $\pm$ 10	48 $\pm$ 15

Dose (mg/kg)	No. of animals	Glu. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0	7	116 $\pm$ 5	10.4 $\pm$ 2.0	0.60 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.01	9.9 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.3	143 $\pm$ 2	4.85 $\pm$ 0.55	107 $\pm$ 2
5	8	121 $\pm$ 11	11.5 $\pm$ 1.8	0.61 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.02	9.8 $\pm$ 0.2	7.6 $\pm$ 0.4	143 $\pm$ 1	4.36 $\pm$ 0.37	106 $\pm$ 1
20	9	114 $\pm$ 9	11.8 $\pm$ 1.7	0.62 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.02	9.8 $\pm$ 0.2	8.4 $\pm$ 0.8	143 $\pm$ 1	4.36 $\pm$ 0.64	105 $\pm$ 1
80	10	118 $\pm$ 12	10.5 $\pm$ 2.5	0.63 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.02	9.9 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 0.7	143 $\pm$ 1	4.34 $\pm$ 0.49	105 $\pm$ 2
300	9	112 $\pm$ 6	11.4 $\pm$ 2.0	0.61 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.01	9.6 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.3	143 $\pm$ 1	4.45 $\pm$ 0.42	106 $\pm$ 2

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

Table 14 Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Dose(mg/kg) Fate No. of animals	0		5		20		80		300	
		TK	FP (T)	TK	(T)	TK	UC/TE(T)	TK	(T)	TK	(T)
		7	3 (10)	10	(10)	9	1 (10)	10	(10)	10	(10)
Lung : Dilatation	-	7	3 (10)	10	(10)	9	0 (9)	10	(10)	10	(10)
	++	0	0 (0)	0	(0)	0	1 (1)	0	(0)	0	(0)
Trachea: Oily and foamy fluid	-	7	3 (10)	10	(10)	9	0 (9)	10	(10)	10	(10)
	+++	0	0 (0)	0	(0)	0	1 (1)	0	(0)	0	(0)
Liver : Diaphragmatic nodule	-	7	3 (10)	9	(9)	9	1 (10)	10	(10)	10	(10)
	+	0	0 (0)	1	(1)	0	0 (0)	0	(0)	0	(0)
Forestomach : Thickening, mucosa	-	7	3 (10)	10	(10)	9	1 (10)	4	(4)	0	(0)
	+	0	0 (0)	0	(0)	0	0 (0)	6	(6)	2	(2)
	++	0	0 (0)	0	(0)	0	0 (0)	0	(0)	8	(8)
Testis : Small	-	7	0 (7)	10	(10)	9	1 (10)	10	(10)	10	(10)
	++	0	3 (3)	0	(0)	0	0 (0)	0	(0)	0	(0)

Grade : -, negative; +, slight; ++, moderate; +++, severe

TK : Terminal kill

FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination

UC/TE : Animal with unsuccessful copulation, which died of technical error

T : Total

Significantly different from control group (** : p<0.01)

Table 15 Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Dose(mg/kg) Fate No. of animals	0		5		20		80		300	
		TK	NP (T)	TK	ED (T)	TK	UC (T)	TK	(T)	TK	KL (T)
		7	3 (10)	8	2 (10)	9	1 (10)	10	(10)	9	1 (10)
Uterus : Retention, greenish fluid	-	7	3 (10)	8	1 (9)	9	1 (10)	10	(10)	9	1 (10)
	++	0	0 (0)	0	1 (1)	0	0 (0)	0	(0)	0	0 (0)
Forestomach : Thickening, mucosa	-	7	3 (10)	8	2 (10)	9	1 (10)	1	(1)	0	0 (0)
	+	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	7	(9) (9)	3	1 (4) (10)
	++	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	2	(0) **	6	0 (6) **

Grade : -, negative; +, slight; ++, moderate

TK : Terminal kill

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation

UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination of mating period

ED : Animal with embryonic death, killed at the termination

KL : Killed because all pups died after delivery

T : Total

Significantly different from control group (** : p<0.01)

Table 16 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 1,3,5-trihydroxybenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity test

	Dose (mg/kg)	No.of Animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Adrenal (mg)	Testis (g)	Epidid. (g)
Absolute	0	10	528 ±32	2.15 ±0.09	13.62 ±1.91	3.13 ±0.22	0.78 ±0.12	1.49 ±0.10	0.40 ±0.08	66.9 ±11.1	2.92 ±0.96	1.28 ±0.34
	5	10	514 ±24	2.17 ±0.12	13.06 ±0.80	3.27 ±0.23	0.79 ±0.09	1.49 ±0.06	0.33 ±0.07	67.5 ±9.7	3.59 ±0.41	1.48 ±0.10
	20	9	514 ±32	2.14 ±0.08	12.98 ±1.07	3.21 ±0.13	0.84 ±0.09	1.50 ±0.09	0.39 ±0.08	57.9 ±7.5	3.53 ±0.40	1.43 ±0.12
	80	10	527 ±35	2.11 ±0.07	12.98 ±1.11	3.18 ±0.27	0.74 ±0.08	1.50 ±0.15	0.39 ±0.10	58.1 ±8.1	3.51 ±0.26	1.46 ±0.15
	300	10	506 ±28	2.17 ±0.09	12.58 ±1.30	3.26 ±0.33	0.76 ±0.15	1.49 ±0.09	0.31 ±0.07	64.9 ±5.3	3.49 ±0.20	1.45 ±0.13
Relative @	0	10	528 ±32	0.41 ±0.04	2.57 ±0.23	0.59 ±0.04	0.15 ±0.02	0.28 ±0.02	0.08 ±0.02	12.7 ±2.4	0.56 ±0.19	0.24 ±0.07
	5	10	514 ±24	0.42 ±0.03	2.54 ±0.11	0.64 ±0.06	0.16 ±0.02	0.29 ±0.02	0.07 ±0.01	13.1 ±1.5	0.70 ±0.08	0.29 ±0.03
	20	9	514 ±32	0.42 ±0.03	2.53 ±0.13	0.63 ±0.04	0.16 ±0.02	0.29 ±0.01	0.07 ±0.01	11.3 ±1.8	0.69 ±0.10	0.28 ±0.03
	80	10	527 ±35	0.40 ±0.03	2.47 ±0.17	0.61 ±0.06	0.14 ±0.01	0.29 ±0.03	0.07 ±0.02	11.1 ±1.8	0.67 ±0.06	0.28 ±0.03
	300	10	506 ±28	0.43 ±0.03	2.48 ±0.14	0.65 ±0.06	0.15 ±0.02	0.30 ±0.01	0.06 ±0.01	12.9 ±1.1	0.69 ±0.05	0.29 ±0.03

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight

Table 17

Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with Hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity test

	Dose (mg/kg)	No. of Animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Adrenal (mg)
Absolute	0	7	308 ±25	1.99 ±0.07	10.20 ±0.86	1.94 ±0.15	0.57 ±0.07	1.02 ±0.06	0.22 ±0.08	85.0 ±12.2
	5	8	305 ±25	1.99 ±0.07	9.97 ±1.03	1.91 ±0.14	0.59 ±0.06	0.99 ±0.06	0.26 ±0.08	84.6 ±11.6
	20	9	314 ±18	2.06 ±0.06	10.04 ±1.04	1.86 ±0.09	0.62 ±0.08	1.00 ±0.05	0.24 ±0.04	79.1 ±12.4
	80	10	306 ±22	1.97 ±0.06	9.80 ±0.81	1.76 ±0.13	0.60 ±0.09	0.98 ±0.09	0.20 ±0.06	79.3 ±8.9
	300	9	299 ±24	2.01 ±0.11	9.92 ±0.96	1.84 ±0.25	0.56 ±0.07	0.99 ±0.07	0.19 ±0.02	82.4 ±14.8
Relative @	0	7	308 ±25	0.65 ±0.04	3.32 ±0.26	0.63 ±0.06	0.18 ±0.01	0.33 ±0.02	0.07 ±0.02	27.6 ±3.5
	5	8	305 ±25	0.66 ±0.05	3.27 ±0.21	0.63 ±0.04	0.20 ±0.02	0.33 ±0.02	0.08 ±0.02	27.8 ±3.3
	20	9	314 ±18	0.66 ±0.04	3.20 ±0.29	0.60 ±0.04	0.20 ±0.03	0.32 ±0.01	0.08 ±0.01	25.2 ±3.5
	80	10	306 ±22	0.65 ±0.05	3.21 ±0.14	0.58 ±0.04	0.20 ±0.02	0.32 ±0.02	0.07 ±0.02	26.0 ±2.6
	300	9	299 ±24	0.67 ±0.03	3.33 ±0.21	0.61 ±0.05	0.19 ±0.02	0.33 ±0.02	0.06 ±0.01	27.6 ±4.7

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight

Table 18-1 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings	Dose(mg/kg) No. of animals	0	5	20	80	300
		5	5	5	5	5
Lung : Metaplasia, osseous	-	5	-	-	-	4
	+	0	-	-	-	1
Heart : Myocardial degeneration/fibrosis	-	2	-	-	-	3
	+	3	-	-	-	2
Liver : Microgranuloma	-	3	-	-	-	3
	+	2	-	-	-	2
Degeneration, fatty, hepatocyte, focal	-	4	-	-	-	5
	+	1	-	-	-	0
Kidney: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	-	0	-	-	-	0
	+	5	-	-	-	5
Basophilic tubules	-	3	-	-	-	3
	+	2	-	-	-	2
Cyst, solitary	-	4	-	-	-	4
	+	1	-	-	-	1
Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-	4	-	-	-	5
	+	1	-	-	-	0
Fibrosis, cortex	-	5	-	-	-	4
	+	0	-	-	-	1
Thymus: Hemorrhage	-	4	-	-	-	5
	+	1	-	-	-	0

Examinations were made for selected 5 of 10 animals in control and 300mg/kg groups and a animal that died.
Grade : -, negative; +, slight; - : Not examined

Table 18-2 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings	Dose(mg/kg) No. of animals	0	5	20	80	300
		5	5	5	5	5
Stomach:Hyperplasia, squamous, forestomach	-	5	5	5	1	0
	+	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4)	0 (5)
	++	0	0	0	0 *	4 **
	+++	0	0	0	0	1
Erosion, forestomach	-	5	5	5	5	2
	+	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3)
	++	0	0	0	0	2
Edema, lamina propria/submucosa, forestomach	-	5	5	5	2	1
	+	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	1 (4)
	++	0	0	0	2	3 *
Cellular infiltration, inflammatory cell, lamina propria/submucosa, forestomach	-	5	5	5	5	1
	+	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	2 (4)
	++	0	0	0	0	2 *
Spleen: Hematopoiesis, extramedullary	-	0	—	—	—	0
	+	5	—	—	—	5
Deposit, hemosiderin	-	0	—	—	—	0
	+	5	—	—	—	5

Examinations were made for selected 5 of 10 animals in each group and a animal that died.

Grade : -, negative; +, slight; ++, moderate; +++, severe; — : Not examined

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

No abnormalities were detected in the brain, thyroid, parathyroid, trachea, intestine, adrenal, urinary bladder, bone marrow, spinal cord, sciatic nerve and lymph node in 5 animals from each of control and 300mg/kg groups.

Table 18-3 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings	Dose(mg/kg)		0		5		20		80		300	
	Fate		TK	FP (T)	TK	(T)	TK	UC/TE(T)	TK	(T)	TK	(T)
	No. of animals		7	3 (10)	10	(10)	9	1 (10)	10	(10)	10	(10)
Testis: Atrophy, seminiferous tubul	-		7	0 (7)	-		-	1	-		10	(10)
	++/+++		0	3 (3)	-		-	0	-		0	(0)
Hyperplasia, interstitial cell	-		7	0 (7)	-		-	1	-		10	(10)
	+		0	3 (3)	-		-	0	-		0	(0)
Epididymis: Decrease, sperm	-		7	0 (7)	-		-	1	-		10	(10)
	++/+++		0	3 (3)	-		-	0	-		0	(0)
Granuloma, spermatic	-		7	3 (10)	-		-	1	-		8	(8)
	+		0	0 (0)	-		-	0	-		2	(2)
Prostate: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	-		5	2 (7)	-		-	1	-		5	(5)
	+		2	1 (3)	-		-	0	-		5	(5)
Seminal vesicle: No abnormalities			7	3 (10)	-		-	1	-		10	(10)

Grade : -, negative; +, slight; ++, moderate; +++, severe; - : Not examined; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; UC/TE : Animal with unsuccessful copulation, which died of technical error

Table 19-1 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings		Dose(mg/kg)	0	5	20	80	300
		No. of animals	5	5	5	5	5
Lung : Accumulation, foam cell	-	4	—	—	—	—	3
	+	1	—	—	—	—	2
Mineralization, artery	-	5	—	—	—	—	4
	+	0	—	—	—	—	1
Heart : Myocardial degeneration/fibrosis	-	4	—	—	—	—	5
	+	1	—	—	—	—	0
Liver : Microgranuloma	-	4	—	—	—	—	5
	+	1	—	—	—	—	0
Kidney: Cyst, solitary	-	4	—	—	—	—	5
	+	1	—	—	—	—	0
Cast, hyaline	-	4	—	—	—	—	5
	+	1	—	—	—	—	0
Basophilic tubules	-	4	—	—	—	—	5
	+	1	—	—	—	—	0
Degeneration, vacuolar, proximal tubular epithelium	-	4	—	—	—	—	5
	+	1	—	—	—	—	0
Spleen: Hematopoiesis, extramedullary	-	0	) (4)	—	—	—	0
	+	4		—	—	—	5
	++	1		—	—	—	0
Deposit, hemosiderin	-	0	—	—	—	—	0
	+	5	—	—	—	—	5

Examinations were made for selected 5 of 10 animals in control and 300mg/kg groups.
Grade : -, negative; +, slight; - : Not examined

Table 19-2 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings	Dose(mg/kg) No. of animals	0	5	20	80	300
		5	5	5	5	5
Stomach:Hyperplasia, squamous, forestomach	-	5	5	5	1	0
	+	0	0	0	3	2
	++	0	0	0	1	3
		(0)	(0)	(0)	(4)	(5)
					*	**
Erosion, forestomach	-	5	5	5	5	4
	++	0	0	0	0	1
Edema, lamina propria/submucosa, forestomach	-	5	5	5	3	0
	+	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	2	4
	+++	0	0	0	0	1
		(0)	(0)	(0)	(2)	(5)
						**
Cellular infiltration, inflammatory cell, lamina propria/submucosa, forestomach	-	5	5	5	4	3
	+	0	0	0	1	2
Thymus: Atrophy, cortical	-	4	—	—	—	5
	+	1	—	—	—	0
Adrenal:Hemorrhage, cortex	-	4	—	—	—	5
	+	1	—	—	—	0

Examinations were made for selected 5 of 10 animals in each group.

Grade : -, negative; +, slight; ++, moderate; +++, severe; — : Not examined

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

No abnormalities were detected in the brain, thyroid, parathyroid, trachea, intestine, urinary bladder, bone marrow, spinal cord, sciatic nerve and lymph node in 5 animals from each of control and 300mg/kg groups.

Table 19-3 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings	Dose(mg/kg)		0		5		20		80		300	
	Fate		TK	NP (T)	TK	ED (T)	TK	UC (T)	TK	(T)	TK	KL (T)
	No. of animals		7	3 (10)	7	2 (10)	9	1 (10)	10	(10)	9	1 (10)
Ovary : No abnormalities			7	3 (10)	—	2	—	1	—		9	1 (10)
Uterus: Hyperplasia, endometrial plus dilatation, lumen	—	5/5	3	—	1	—	1	—	5/5	—		
	+	0/5	0	—	1	—	0	—	0/5	—		
Pituitary:No abnormalities			—	3	—	2	—	1	—		—	1
Mammary gl.:No abnormalities			—	—	—	—	—	—	—		—	1

Grade : —, negative; +, slight; — : Not examined

NP : Non-pregnant, killed on 28 days after copulation

UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination of mating period

ED : Animal with embrionic death, killed at the termination

KL : Killed because all pups died after delivery

Table 20 Reproduction results of rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	0	5	20	80	300
Estrus cycle (days, Mean $\pm$ S.D.)		4.2 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.1
No. of pairs mated		10	10	10	10	10
No. of pairs with successful copulation		10	10	9	10	10
Copulation index (%)		100	100	90	100	100
Pairing days until copulation (days, Mean $\pm$ S.D.)		2.5 $\pm$ 1.2	3.3 $\pm$ 4.0	2.0 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 1.2	2.5 $\pm$ 1.4
No. of pregnant females		7	10	9	10	10
Fertility index (%)		70	100	100	100	100
No. of corpora lutea (Mean $\pm$ S.D.)		19.7 $\pm$ 2.8	18.4 $\pm$ 4.1	19.3 $\pm$ 3.3	17.5 $\pm$ 1.9	18.2 $\pm$ 2.6
No. of implantation sites (Mean $\pm$ S.D.)		15.6 $\pm$ 1.6	13.2 $\pm$ 6.3	14.9 $\pm$ 2.4	15.9 $\pm$ 1.5	15.3 $\pm$ 2.4
Implantation index (%), Mean $\pm$ S.D.)		79.9 $\pm$ 11.5	68.6 $\pm$ 31.4	79.2 $\pm$ 18.6	91.4 $\pm$ 8.9	84.9 $\pm$ 12.3
No. of pregnant females with parturition		7	8	9	10	10
Gestation length (days, Mean $\pm$ S.D.)		22.4 $\pm$ 0.5	22.5 $\pm$ 0.5	22.4 $\pm$ 0.5	22.6 $\pm$ 0.5	22.5 $\pm$ 0.5
No. of pregnant females with live pups		7	8	9	10	10
Gestation index (%)		100	80	100	100	100
No. of pregnant females with live pups on day 4		7	8	9	10	9

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated) $\times$ 100

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation) $\times$ 100

Gestation index = (No. of females with live pups/No. of living pregnant females) $\times$ 100

Table 21

Litter results of female rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	5	20	80	300
No. of pups born	15.0± 1.7	11.9± 6.4	13.1± 4.0	14.8± 2.0	13.9± 1.7
Delivery index (%)	96.3± 4.8	73.8±39.4	85.4±20.0	93.3±10.1	91.4± 6.1
No. of pups alive on day 0 of lactation					
Total	15.0± 1.7	14.9± 1.6	13.0± 3.9	14.4± 2.0	12.3± 4.2
Male	6.6± 2.1	7.4± 1.5	6.4± 2.9	6.7± 2.0	5.7± 2.0
Female	8.4± 1.6	7.5± 2.4	6.6± 2.4	7.7± 2.5	6.6± 2.5
Live birth index (%)	100 ± 0	100 ± 0	99.3± 2.1	97.4± 4.6	88.3±27.2
Sex ratio (Male/Female)	0.78	0.98	0.97	0.85	0.88
No. of pups alive on day 4 of lactation					
Total	14.7± 1.4	14.9± 1.6	12.9± 3.8	14.2± 1.8	12.0± 4.7
Male	6.4± 1.8	7.4± 1.5	6.3± 2.9	6.6± 2.2	5.6± 2.3
Female	8.3± 1.5	7.5± 2.4	6.6± 2.4	7.6± 2.5	6.4± 2.7
Viability index (%)	98.3± 2.9	100 ± 0	99.3± 2.2	98.7± 2.7	89.3±31.5
Body weight of live pups (g)					
on day 0					
Male	6.8± 0.6	7.0± 0.5	7.5± 0.6	7.0± 0.7	7.3± 0.9
Female	6.6± 0.7	6.8± 0.7	7.0± 0.5	6.6± 0.6	6.9± 0.8
on day 4					
Male	10.7± 1.5	11.4± 1.0	12.1± 1.1	11.4± 1.5	11.7± 1.8
Female	10.4± 1.8	10.9± 1.1	11.7± 1.2	11.0± 1.4	11.2± 1.6

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

Live birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of pups born)×100

Viability index = (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0)×100

Sex ratio = Total No. of male pups / Total No. of female pups

Each value is expressed as Mean ± S.D., except sex ratio.

Table 22

Incidence of external findings of rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	5	20	80	300
External	No. of pups examined	105	119	118	148	139
	No. of pups with external anomalies	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

(): No. of pups (Mean $\pm$ S.D. of individual litter percentages)

Table 23 - 1 Incidence of visceral findings of rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	5	20	80	300
Visceral	No. of pups examined	104	119	118	147	138
	No. of pups with visceral anomalies	0	0	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

(): No. of pups (Mean $\pm$ S.D. of individual litter percentages)

Table 23-2 Incidence of visceral findings of rats treated orally with hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium salt in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	5	20	80	300
Visceral	No. of pups examined	104	119	118	147	138
	No. of pups with visceral variations					
		2 (2.2±3.8)	3 (2.5±4.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Visceral variations					
	Thymic remnant in neck	0 (0)	1 (1.0±2.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Persistent left umbilical artery	2 (2.2±3.8)	1 (0.8±2.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Dilatation of renal pelvis	0 (0)	1 (0.8±2.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

(): No. of pups (Mean ± S.D. of individual litter percentages)