

最終報告書

1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt 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 ~~毒物研究所~~

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 ~~10916~~

TEL 0463-82-4751

目次

要約	5
材料と方法	6
1. 被験物質	6
2. 使用動物と飼育環境	7
3. 投与検体	8
1) 調製法	8
2) 含量試験	8
4. 投与量の設定および投与方法	9
5. 観察および検査	10
1) 親動物 (F_0)	10
2) 出生児 (F_1)	11
6. データの解析法	11
試験成績	12
1. 親動物	12
1) 一般状態	12
2) 体重	12
3) 体重増加量	12
4) 体重累積増加量	12
5) 摂餌量	12
6) 器官重量	13
7) 剖検所見	13
8) 病理組織学検査	13
2. 生殖能力	14
1) 性周期および交配成績	14
2) 黄体数および着床数	14
3) 分娩および哺育児所見	14
3. 出生児	14
1) 生存性	14
2) 体重	14
3) 出生児観察	14
考察	14
Tables	16

要約

1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt (以下 SIPA と記す)の親動物への影響および新生児の発育に及ぼす影響を検討するために、SIPA を 0 (注射用水)、100、300 および 1000 mg/kg の用量で雌雄の Sprague-Dawley 系ラット (雌雄各 13 匹/群) に 10 週齢から 1 日 1 回、強制経口投与した。投与 14 日から 2 週間を限度として交配させ、雄は 42 日間投与した後に剖検した。雌は交配後、自然分娩させて哺育 4 日まで投与した後に、母動物および出生児は哺育 5 日に剖検した。その結果を以下に要約した。

1. 親動物所見

雌雄ともに死亡例は認められなかった。一般状態の観察では、300 mg/kg 以上の投与群の雌雄に軟便、1000 mg/kg 投与群の雌雄に投与後の流涎が認められた。雌雄の体重、摂餌量および生殖器重量に SIPA 投与の影響は認められなかった。剖検では、1000 mg/kg 投与群の雌雄に前胃粘膜の肥厚が観察され、病理組織学検査で前胃粘膜に扁平上皮細胞のびまん性の過形成が認められた。

2. 生殖能力所見

雌の性周期、雌雄の交尾率および受胎率、妊娠動物の黄体数、着床数、着床率、妊娠期間および出産率に SIPA 投与の影響は認められなかった。また、母動物の分娩状態および哺育状態に異常は認められなかった。

3. 出生児所見

児の生存性、性比および体重に SIPA 投与の影響は認められず、児の形態観察においても異常は認められなかった。

4. 無毒性量 (NOAEL)

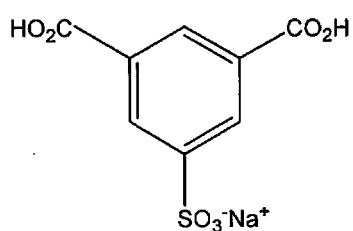
本試験条件下では、親動物に対する無毒性量は 300 mg/kg 以上の投与群の雌雄に軟便が認められたことから 100 mg/kg/day、親動物の生殖能力および出生児に対する無毒性量はいずれの項目でも影響が認められなかったことから 1000 mg/kg/day と判断した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt (別名: benzenesulfonic acid, 3,5-dicarboxy-, sodium salt, CAS No. 6362-79-4、分子式: $C_6H_4O_7SNa$ 、分子量: 268.18、純度: 99.7%、色相: ハーゼン 20 ユニット未満、不純物: 水分 0.1% および Fe 分 5 ppm 未満、製造年月日: 2008 年 11 月 7 日、以下 SIPA と記す) は 提供され、2008 年 12 月 26 日に受領し、2009 年 4 月 22 日まで被験物質受領保管室に室温 (実測値 16.1～22.7℃) で保管した。また、2009 年 4 月 22 日から使用時まで被験物質保管室 2 にて室温 (実測値 16.8～22.3℃) で保管した。

被験物質の構造式を以下に示す。



被験物質の安定性については、GLP 基準での確認はされていないが、本被験物質を用いる試験（試験番号：A-08-046、R-08-008、R-08-009）に使用したものと同一ロットの被験物質について、被験物質入手前ならびに動物実験終了後に入手元において品質試験が実施され、測定結果に変化がないことを確認した（Appendix A-1、Appendix A-2）。

2. 使用動物と飼育環境

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 系 [CrI:CD(SD)、SPF] ラット、雄 62 匹、雌 73 匹を購入し、6 号室に収容して検疫と飼育環境への馴化を兼ね、入荷日を含む 17 日間飼育した。その間毎日、一般状態を観察し、入荷日および検疫終了時に体重を測定した。また、雌動物については、入荷 5 日目から毎日、性周期を観察した。検疫・馴化期間中はフェルトペンで尾に馴化番号を標識し、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た。入荷動物の入荷日および検疫終了日の体重は下記の通りであった。

動物入荷日	: 2009 年 4 月 6 日
入荷時体重	: 雄 256.8～295.6 g、雌 184.6～215.7 g
検疫終了日	: 2009 年 4 月 22 日
検疫終了時体重	: 雄 307.3～454.9 g、雌 234.5～306.7 g

検疫・馴化の結果、雄動物で体重増加量が少なかった 1 匹（馴化番号：55）と、雌動物で規則的な性周期の回帰が認められなかった 16 匹（馴化番号：2、4、6、13、17、19、22、23、24、25、28、40、57、59、65 および 72）は、それぞれ群分けの対象から除外し、検疫・馴化終了時の体重に基づく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、群ごとに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、飼育ケージに掛けた。試験に使用しなかった動物は、同じ飼育室で飼育し、2009 年 5 月 19 日に雌 5 匹を定期病原性微生物検査に供し、残りの雄 10 匹と雌 16 匹は 2009 年 4 月 28 日から 2009 年 6 月 25 日の間に採血および解剖練習に使用した。

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、照明 12 時間（7～19 時点灯）に設定された飼育室で、金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に 1 匹ずつ収容し、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。交尾の確認された雌動物は、妊娠 18 日（腔栓あるいは精子確認日＝妊娠 0 日）から哺育 5 日（分娩日＝哺育 0 日）まで床敷として紙パルプ製チップ（ペパークリーン、日本エスエルシー）を入れたラット用プラスチック製繁殖ケージ（350w×400d×180h mm）に収容し、飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値はそれぞれ 22.5～23.5℃、49.0～71.0%であった。また、供給した飼料、水および床敷には試験に支障をきたす可能性のある混入物は認められなかった。

3. 投与検体

1) 調製法

秤量した被験物質に、その秤量値の 5 倍の容量となる媒体の日局注射用水(製造番号:A89AA1、光製薬)を加え、20.0 w/v%液を調製した。さらに、20.0 w/v%液を媒体によって段階希釈し、6.00 ならびに 2.00 w/v%液を調製した。調製した投与検体は冷蔵(実測値 1~8℃)、遮光条件下で保管し、調製後 8 日以内に使用した。

投与検体の安定性については、先に秦野研究所で実施した本被験物質を用いる単回投与毒性試験(試験番号:A-08-046)において、3.00 mg/mL (0.30 w/v%)液および 200 mg/mL (20.0 w/v%)液は、冷蔵、遮光条件下で調製後 8 日間安定であることが確認されている。

2) 含量試験

初回調製した各濃度の検体について、被験物質の含量測定を実施した。その結果、各投与検体中における被験物質の平均含量は 99.5~104%であり、各測定値のばらつきは 97.4~104%であった(Appendix B)。これらの値は、試験計画書に記載した判断基準の範囲内(平均含量が調製濃度の 90.0~110%、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0~110%以内)であることを確認した。調製検体中の被験物質濃度は以下の方法で測定した。

①標準溶液の調製

被験物質 10.00 mg を精密に量り、蒸留水(HPLC 用、和光純薬工業)に溶解して正確に 20 mL とした。さらにこの溶液 2 mL を採り、蒸留水を加えて正確に 20 mL とし、標準原液(50.00 µg/mL)とした。この標準原液 1、2 および 2 mL を採り、それぞれ蒸留水を加えて正確に 50、20 および 10 mL とし、標準溶液(1.000、5.000 および 10.00 µg/mL)を調製した。標準溶液は n=1 で調製した。

②試料溶液の作製

調製検体の 0.5 mL を採取し、蒸留水で希釈し、試料溶液を調製した(5.00 または 6.00 µg/mL)。試料溶液は各調製検体につき n=3 で調製した。

③調製検体中濃度測定法

試料溶液および標準溶液を以下に示した HPLC 条件下で測定した。得られた SIPA のピーク面積から、標準溶液のピーク面積より作成した検量線を用いて調製検体中の SIPA 濃度を算出した。各試料溶液は n=1 で測定し、標準溶液については n=3 で測定した。

HPLC 条件

HPLC システム構成	LC-10AD _{vp} (ポンプ)、SLC-10A _{vp} (システムコントローラ)、 SIL-10AD _{vp} (オートインジェクタ)、CTO-10AC _{vp} (カラムオーブン)、 SPD-10A _{vp} (検出器)、C-R7A(データ処理装置)
分析カラム	CAPCELL PAK C18 UG120

(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m、資生堂)

移動相	リン酸溶液(1→1000) ⁱ⁾ /メタノール(HPLC 用、和光純薬工業)混液 (100:5 v/v)
流量	1.0 mL/min
カラム設定温度	40°C
試料設定温度	室温
測定波長	220 nm
試料注入量	10 μ L
オートインジェクタ洗浄液	蒸留水

i)リン酸(試薬特級、和光純薬工業)1 mL に蒸留水を加えて 1000 mL とする。

4. 投与量の設定および投与方法

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

投与量は、本試験における投与量を設定する目的で実施した SIPA のラットを用いる経口投与簡易生殖試験予備試験(試験番号:R-08-008、非 GLP)の結果をもとに設定した。予備試験では、雌動物の交配前 1 週間から哺育 4 日まで 0、100、300、1000 mg/kg の用量で SIPA を投与した。その結果、1000 mg/kg 投与群で軟便が観察された以外は、母動物に SIPA 投与による影響は認められず、分娩状態、児の生存性にも対照群との間で差は認められなかった。これらのことから、本試験における高用量群の投与量をガイドラインに定められた最高投与用量である 1000 mg/kg に設定し、以下、公比 3 で徐して中用量を 300 mg/kg、低用量を 100 mg/kg とした。

投与期間は、雄に対しては交配前 2 週間、交配期間(最長 2 週間)を通して剖検前日まで(総投与回数 42 回)、雌に対しては交配前 2 週間および交配期間(最長 2 週間)、さらに交尾が確認された雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育 4 日まで(総投与回数 41~45 回)、交尾は確認されたが分娩しなかった雌は妊娠 25 日相当日まで(総投与回数 40~41 回)、交尾が確認されなかった雌では剖検前日まで(総投与回数 53 回)とし、1 日 1 回、9 時 1 分から 11 時 50 分の間に投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、雄および交配前、交配中の雌では、週 1 回測定する体重を基に、交尾確認雌では、最新の測定日の体重を基に算出した。なお、対照群には日局注射用水を同様に投与した。

各群の投与量、投与容量、調製濃度および動物番号は次の通りである。

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	0	0	5	MX01001~MX01013	FB01001~FB01013
2	SIPA	100	2.00	5	MX02001~MX02013	FB02001~FB02013
3	SIPA	300	6.00	5	MX03001~MX03013	FB03001~FB03013
4	SIPA	1000	20.0	5	MX04001~MX04013	FB04001~FB04013

5. 観察および検査

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回観察した。症状が発現した場合は、すみやかな回復が期待されない所見を除き、症状の発現している間、断続的に観察を継続した。

② 体重測定

雄および交尾が確認されなかった雌は投与1(投与開始日)、7、14、21、28、35、42、49日および剖検日に体重を測定した。交尾が確認された雌では妊娠0(交尾確認日)、7、14、21日、哺育0(分娩日)、4日および剖検日に、交尾が確認されたが分娩しなかった雌では妊娠26日相当日に体重を測定した。

③ 摂餌量測定

雄および交尾が確認されなかった雌は投与1～2、7～8、13～14、29～30、35～36、41～42、48～49日に摂餌量を測定した。交尾が確認された雌では妊娠0～1、7～8、14～15、20～21日、分娩した雌では哺育3～4日の摂餌量を算出した。

④ 性周期

各群とも全例の雌について、群分け日までの性周期観察に引き続き、投与開始後も膣スミア標本を毎日作製し、同居後、交尾が確認されるまで性周期を観察した。性周期は発情期、発情前期および発情休止期に分類し、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)を求めた。

⑤ 交配

交配は、投与14日の15時25分から最長2週間、同群内の雌雄を1:1で連日同居させた。交尾の確認は、膣スミア中の精子の存在あるいは膣栓を確認することにより行い、いずれかが確認された日を妊娠0日と起算して同居を解消し、個別に飼育した。交配の結果および妊娠の成否により、各投与群における、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[(交尾確認動物数/交配に用いた動物数)×100, %]、妊娠率[(妊娠動物数/交尾確認動物数)×100, %]を算出した。

⑥ 分娩・哺育状態の観察

各群とも交尾が確認された雌は全例を自然分娩させた。分娩の確認は、妊娠21日相当日から分娩が確認されるまで毎日行い、午前11時までに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。分娩状態の観察は、直接観察可能な動物については異常の有無を断続的に観察し、直接観察できなかった動物についても、分娩前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1～5日の間、毎日哺育状態を観察した。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[(生児出産雌数/妊娠動物数)×100, %]を算出し、哺育5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[(着床数/妊娠黄体数)×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、精巣および精巣上体の重量を測定した。精巣および精巣上体はブアン液に(長期保存は0.1Mリン酸緩衝10%

ホルマリン溶液)、また、乳腺、前立腺および精嚢は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定し、対照群および 1000 mg/kg 投与群の精嚢および精嚢上体は、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 5 日に、交尾は確認されたが分娩しなかった雌は妊娠 26 日相当日に、また交尾が確認されなかった雌は投与 53 日の翌日に、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。また、雌雄とも、剖検時に異常の認められた器官についても 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定し、病理組織学検査を実施した。

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 $[(\text{出產生児数}/\text{着床痕数}) \times 100, \%]$ 、および出生率 $[(\text{出產生児数}/\text{産児数}) \times 100, \%]$ を算出した。哺育 1~5 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、4 日ならびに剖検日に個別の体重を測定し、各腹ごとに雌雄別の平均体重値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、0.1M 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 5 日にセボフルラン吸入麻酔下で放血致死させて剖検し、外表および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、交尾率および受胎率については 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、グレード分けしたデータは Mann-Whitney の U 検定(有意水準:5%)により、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定(有意水準:5%)により対照群との間で有意差検定を行った。

その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは腹ごとの平均値を 1 標本として、先ず、Bartlett の方法により各群の分散の一樣性について検定(有意水準:5%)を行った。分散が一樣である場合には、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る場合は、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 となる場合および分散が一樣でない場合には、Kruskal-Wallis の順位和検定(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められる場合には、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 2、Appendix 1-1～Appendix 1-4、Appendix 2-1～Appendix 2-4)

雌雄とも死亡例は認められなかった。

100 mg/kg 投与群では、上顎切歯が折れた例が投与 15 日～22 日に雄 1 例で観察された。300 mg/kg 投与群では、軟便が投与 6 日から投与 14 日の間に雄 8 例、投与 6 日に雌 1 例で観察された。1000 mg/kg 投与群では、軟便が雄では投与 2 日から、雌では投与 3 日からいずれも全例で散見され、投与後の流涎が雄では投与 29 日から投与 35 日の間に 8 例、雌では妊娠 11 日から哺育 4 日の間に 3 例で認められた。

2) 体重 (Table 3、Table 6、Appendix 3-1～Appendix 3-4、Appendix 6-1～Appendix 6-4)

雌雄とも体重実測値には、SIPA 各投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

3) 体重増加量 (Table 4、Table 7、Appendix 4-1～Appendix 4-4、Appendix 7-1～Appendix 7-4)

1000 mg/kg 投与群において、雌の妊娠 14～21 日の体重増加量が一過性に有意な高値を示した。雄および雌の 300 mg/kg 以下の SIPA 投与群では、対照群との間に有意な差は認められなかった。

4) 体重累積増加量 (Table 5、Table 8、Appendix 5-1～Appendix 5-4、Appendix 8-1～Appendix 8-4)

雌雄とも体重累積増加量には、SIPA 各投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

5) 摂餌量 (Table 9、Table 10、Appendix 9-1～Appendix 9-4、Appendix 10-1～Appendix 10-4)

1000 mg/kg 投与群において、雄の投与 35～36 日と雌の投与 20～21 日の摂餌量が、それぞれ対照

群に比較して有意な高値を示した。300 mg/kg 以下の SIPA 投与群では、対照群との間に有意な差は認められなかった。

6) 器官重量 (Table 11、Table 12、Appendix 11-1～Appendix 11-4、Appendix 12-1～Appendix 12-4)

精巣、精巣上体、卵巣の絶対重量および相対重量には、SIPA 各投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

7) 剖検所見 (Table 13、Table 14、Appendix 13、Appendix 14)

雄では、対照群、100 および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例の両側の精巣に小型化が観察され、そのうち対照群の 1 例は水腫様を呈していた。また、対照群の 1 例および 1000 mg/kg 投与群の 2 例の両側の精巣上体に小型化がみられたほか、100 mg/kg 投与群の 1 例では両側に、1000 mg/kg 投与群の 1 例では右側に黄白色の結節が観察された。

雌では、未分娩と判断された 100 mg/kg 投与群の 1 例で、子宮内に遺残した 1 例の胎児が観察された。

また、1000 mg/kg 投与群の雄 11 例および雌 2 例の胃には、前胃粘膜の肥厚が観察された。その他、雄の 1000 mg/kg 投与群の 1 例で、左側腎臓の欠損および右側腎臓の腫大が認められた。

8) 病理組織学検査 (Table 15、Table 16、Appendix 15、Appendix 16)

精巣では、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 2 例、100 mg/kg 投与群の 1 例の両側に、対照群の 2 例および 1000 mg/kg 投与群の 1 例の片側に、精細管の萎縮が観察された。異常所見が認められた例のうち、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例の両側には、ライディヒ細胞のびまん性の過形成が、1000 mg/kg 投与群の 1 例には多核巨細胞も観察された。

精巣上体では、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 2 例、100 mg/kg 投与群の 1 例の両側の管腔に細胞残屑が観察され、そのうち対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例には、管腔に精子の減少が、100 mg/kg 投与群の例には、両側に精子肉芽腫が認められた。同様に、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 2 例の片側の管腔に細胞残屑が観察され、そのうち 1000 mg/kg 投与群の例には、片側に精子肉芽腫が認められた。

卵巣では、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例の片側に卵胞性嚢腫が観察された。

剖検時、異常所見が認められた胃では、1000 mg/kg 投与群の雄 11 例および雌 2 例の前胃粘膜に扁平上皮細胞のびまん性の過形成が認められた。

剖検時、左側が欠損していた雄 1 例の右側腎臓では、皮質の近位尿細管上皮に好酸性小体が見られたほか、同皮質に好塩基性尿細管も観察された。

2. 生殖能力

1) 性周期および交配成績 (Table 17、Table 18、Appendix 17-1～Appendix 17-4、Appendix 18-1～Appendix 18-4)

投与開始後の平均発情回帰日数、および投与開始後に性周期の型が変化した動物の頻度には、対照群と SIPA 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

100 mg/kg 投与群では、膣スミア像が同居翌日から 2 週間連続して発情休止期を示し、交尾が確認されなかった動物が 1 例認められたが、交尾率および受胎率に SIPA 投与の影響は認められず、交尾までの日数およびその間の発情回帰にも、対照群と SIPA 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

2) 黄体数および着床数 (Table 19、Appendix 19-1～Appendix 19-4)

黄体数、着床数および着床率には、対照群と SIPA 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

3) 分娩および哺育児所見 (Table 19、Appendix 19-1～Appendix 19-4)

100 mg/kg 投与群の 1 例 (子宮内に遺残した 1 例の胎児がみられた例) の妊娠動物が出産しなかったが、対照群、300 mg/kg および 1000 mg/kg 投与群では全例の妊娠動物が生児を出産し、妊娠期間および出産率には対照群と SIPA 各投与群との間に有意な差は認められなかった。また、出産した動物の全例で分娩状態および哺育状態の異常は認められなかった。

3. 出生児

1) 生存性 (Table 19、Appendix 19-1～Appendix 19-4)

出生率、産児数、分娩率、出産生児数、生児出産率、哺育 4 日の生児数、新生児生存率および性比には、対照群と SIPA 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

2) 体重 (Table 20、Appendix 20-1～Appendix 20-4)

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

3) 出生児観察 (Table 21)

哺育 0 日の生存産児の形態観察、死亡児および哺育 5 日の剖検時の形態観察において、いずれの動物にも異常は観察されなかった。

考察

SIPA の 100、300 および 1000 mg/kg を Sprague-Dawley 系ラットに雄 42 日間、雌には交配前 2 週間および交配期間、妊娠期間を通して哺育 4 日まで経口投与し、SIPA の生殖毒性について検討した。

その結果、雌雄ともに 300 mg/kg 以上の投与群において軟便が認められた。本試験における投与量を設定する目的で実施した予備試験の 1000 mg/kg 投与群でも軟便が観察されていることから、300 mg/kg 以上の投与群で観察された軟便は、SIPA の投与の影響によるものと考えられる。

1000 mg/kg 投与群の雌雄では、投与後に流涎、剖検時に前胃粘膜の肥厚が認められた。前胃粘膜の肥厚は病理組織学検査で扁平上皮細胞の過形成であることが確認されたことから、これらの変化は SIPA の刺激性に起因したものと推察される。

1000 mg/kg 投与群においては、雄の投与 35～36 日と雌の投与 20～21 日の摂餌量が増加し、雌の妊娠 14～21 日の体重増加量が高値を示した。しかし、いずれもの変化も一過性であり、体重の実測値と累積増加量に有意な変化がみられていないことから、SIPA の体重および摂餌量への影響を示唆する変化ではないと判断した。

1000 mg/kg 投与群では、精細管の萎縮が 3 例、卵胞性嚢腫が 1 例に観察された。同様の変化は、対照群にも認められており、1000 mg/kg 投与群の雌は全例が妊娠したこと、精巣、精巣上体および卵巣の重量には対照群と SIPA 各投与群の間に差がみられていないことから、SIPA の生殖器への影響を示唆する変化ではないと考えられた。

生殖能力検査では、同居開始から発情休止期が連続した 100 mg/kg 投与群の 1 例以外は、交尾が確認され、受胎率にも SIPA 投与の影響は認められなかった。雌の性周期、妊娠動物の黄体数、着床数、着床率、妊娠期間および出産率に SIPA 投与の影響は認められず、母動物の分娩状態および哺育状態に異常は認められなかった。

出生児に関しては、出生児の生存性、体重ならびに形態観察においても、SIPA 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、親動物に対する無毒性量は 300 mg/kg 以上の投与群の雌雄に軟便が認められたことから 100 mg/kg/day、親動物の生殖能力および出生児に対する無毒性量はいずれの項目でも影響が認められなかったことから 1000 mg/kg/day と判断した。

Table 1

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Clinical signs of males

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Number of animals	13	13	13	13
Number of animals with abnormality	0	1	8	13
<u>Category of abnormality</u>				
Loose stool	0	0	8	13
Salivation	0	0	0	8
Loss of teeth	0	1	0	0

a), vehicle control, water for injection (5mL/kg)

Table 2

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Clinical signs of females

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Number of animals	13	13	13	13
Number of animals with abnormality	0	0	1	13
<u>Category of abnormality</u>				
Loose stool	0	0	1	13
Salivation	0	0	0	3
Loss of teeth	0	0	0	0

a), vehicle control, water for injection (5mL/kg)

Table 3

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Body weight of males (g), Mean $\pm$ S.D.(N)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
<u>Days of treatment</u>				
1	410.9 $\pm$ 20.4 (13)	419.1 $\pm$ 19.5 (13)	416.4 $\pm$ 16.2 (13)	413.9 $\pm$ 21.2 (13)
7	430.7 $\pm$ 23.4 (13)	443.0 $\pm$ 24.0 (13)	437.4 $\pm$ 20.2 (13)	435.3 $\pm$ 22.6 (13)
14	455.8 $\pm$ 31.0 (13)	466.3 $\pm$ 26.8 (13)	461.1 $\pm$ 25.9 (13)	459.2 $\pm$ 30.1 (13)
21	473.7 $\pm$ 33.5 (13)	483.0 $\pm$ 26.4 (13)	482.7 $\pm$ 28.1 (13)	478.5 $\pm$ 32.0 (13)
28	494.4 $\pm$ 37.4 (13)	504.8 $\pm$ 28.8 (13)	504.7 $\pm$ 33.9 (13)	498.3 $\pm$ 35.8 (13)
35	514.1 $\pm$ 42.2 (13)	522.3 $\pm$ 30.8 (13)	520.4 $\pm$ 39.4 (13)	517.4 $\pm$ 41.6 (13)
42	525.2 $\pm$ 42.2 (13)	533.0 $\pm$ 31.4 (13)	525.6 $\pm$ 42.9 (13)	528.8 $\pm$ 41.0 (13)

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 4

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
 Body weight gain of males (g), Mean $\pm$ S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
<u>Days of treatment</u>				
1-7	19.7 $\pm$ 7.8 (13)	23.9 $\pm$ 8.8 (13)	21.0 $\pm$ 7.6 (13)	21.4 $\pm$ 5.5 (13)
7-14	25.2 $\pm$ 10.0 (13)	23.3 $\pm$ 9.2 (13)	23.7 $\pm$ 8.8 (13)	23.9 $\pm$ 9.7 (13)
14-21	17.8 $\pm$ 6.9 (13)	16.8 $\pm$ 6.2 (13)	21.6 $\pm$ 6.2 (13)	19.4 $\pm$ 7.1 (13)
21-28	20.8 $\pm$ 5.2 (13)	21.8 $\pm$ 6.5 (13)	22.0 $\pm$ 7.8 (13)	19.7 $\pm$ 6.4 (13)
28-35	19.7 $\pm$ 5.7 (13)	17.5 $\pm$ 4.7 (13)	15.7 $\pm$ 6.6 (13)	19.2 $\pm$ 8.0 (13)
35-42	11.1 $\pm$ 8.6 (13)	10.7 $\pm$ 6.3 (13)	5.2 $\pm$ 10.5 (13)	11.4 $\pm$ 5.6 (13)

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 5

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Cumulative body weight gain of males (g), Mean $\pm$ S.D.(N)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
<u>Days of treatment</u>				
1-7	19.7 $\pm$ 7.8 (13)	23.9 $\pm$ 8.8 (13)	21.0 $\pm$ 7.6 (13)	21.4 $\pm$ 5.5 (13)
1-14	44.9 $\pm$ 15.7 (13)	47.2 $\pm$ 15.6 (13)	44.7 $\pm$ 14.8 (13)	45.3 $\pm$ 11.8 (13)
1-21	62.7 $\pm$ 16.8 (13)	63.9 $\pm$ 14.9 (13)	66.3 $\pm$ 18.5 (13)	64.7 $\pm$ 15.5 (13)
1-28	83.5 $\pm$ 20.1 (13)	85.7 $\pm$ 16.7 (13)	88.3 $\pm$ 24.2 (13)	84.4 $\pm$ 20.8 (13)
1-35	103.2 $\pm$ 25.0 (13)	103.2 $\pm$ 18.4 (13)	104.0 $\pm$ 29.9 (13)	103.6 $\pm$ 25.4 (13)
1-42	114.2 $\pm$ 25.7 (13)	114.0 $\pm$ 20.6 (13)	109.2 $\pm$ 32.5 (13)	115.0 $\pm$ 26.2 (13)

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 6

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
 Body weight of females (g), Mean $\pm$ S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
<u>Days of treatment</u>				
1	259.6 $\pm$ 13.1 (13)	259.7 $\pm$ 11.8 (13)	254.7 $\pm$ 13.3 (13)	262.1 $\pm$ 13.4 (13)
7	266.2 $\pm$ 12.1 (13)	266.3 $\pm$ 16.2 (13)	263.7 $\pm$ 13.9 (13)	271.5 $\pm$ 13.5 (13)
14	278.7 $\pm$ 14.7 (13)	276.8 $\pm$ 19.1 (13)	272.9 $\pm$ 16.1 (13)	281.6 $\pm$ 18.2 (13)
<u>Days of pregnancy</u>				
0	283.2 $\pm$ 12.2 (11)	279.5 $\pm$ 13.8 (11)	280.5 $\pm$ 16.7 (12)	288.7 $\pm$ 16.7 (13)
7	317.5 $\pm$ 16.0 (11)	314.0 $\pm$ 16.6 (11)	319.4 $\pm$ 16.8 (12)	322.1 $\pm$ 19.6 (13)
14	353.7 $\pm$ 18.9 (11)	349.3 $\pm$ 19.8 (11)	357.1 $\pm$ 20.0 (12)	357.0 $\pm$ 20.6 (13)
21	434.1 $\pm$ 22.7 (11)	423.9 $\pm$ 31.9 (11)	444.5 $\pm$ 36.4 (12)	449.7 $\pm$ 23.4 (13)
<u>Days of lactation</u>				
0	311.5 $\pm$ 33.6 (11)	311.8 $\pm$ 34.8 (10)	315.1 $\pm$ 35.0 (12)	327.5 $\pm$ 24.9 (13)
4	344.9 $\pm$ 24.0 (11)	330.2 $\pm$ 26.1 (10)	342.8 $\pm$ 26.1 (12)	350.5 $\pm$ 17.3 (13)

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 7

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats

Body weight gain of females (g), Mean $\pm$ S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
<u>Days of treatment</u>				
1-7	6.5 $\pm$ 5.5 (13)	6.6 $\pm$ 6.6 (13)	9.0 $\pm$ 8.4 (13)	9.4 $\pm$ 4.2 (13)
7-14	12.5 $\pm$ 4.3 (13)	10.6 $\pm$ 7.6 (13)	9.2 $\pm$ 4.6 (13)	10.2 $\pm$ 7.2 (13)
<u>Days of pregnancy</u>				
0-7	34.4 $\pm$ 6.7 (11)	34.6 $\pm$ 10.8 (11)	39.0 $\pm$ 4.4 (12)	33.4 $\pm$ 9.6 (13)
7-14	36.1 $\pm$ 5.6 (11)	35.3 $\pm$ 5.7 (11)	37.7 $\pm$ 5.0 (12)	34.9 $\pm$ 7.4 (13)
14-21	80.4 $\pm$ 8.6 (11)	74.6 $\pm$ 21.2 (11)	87.4 $\pm$ 18.4 (12)	92.7 $\pm$ 23.6 (13) *
<u>Days of lactation</u>				
0-4	33.4 $\pm$ 23.0 (11)	18.4 $\pm$ 30.3 (10)	27.6 $\pm$ 13.0 (12)	22.9 $\pm$ 15.4 (13)

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 8

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Cumulative body weight gain of females (g), Mean $\pm$ S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
<u>Days of treatment</u>				
1-7	6.5 $\pm$ 5.5 (13)	6.6 $\pm$ 6.6 (13)	9.0 $\pm$ 8.4 (13)	9.4 $\pm$ 4.2 (13)
1-14	19.1 $\pm$ 7.7 (13)	17.2 $\pm$ 11.1 (13)	18.1 $\pm$ 10.5 (13)	19.5 $\pm$ 6.2 (13)
<u>Days of pregnancy</u>				
0-7	34.4 $\pm$ 6.7 (11)	34.6 $\pm$ 10.8 (11)	39.0 $\pm$ 4.4 (12)	33.4 $\pm$ 9.6 (13)
0-14	70.5 $\pm$ 10.4 (11)	69.9 $\pm$ 12.8 (11)	76.6 $\pm$ 7.4 (12)	68.3 $\pm$ 9.2 (13)
0-21	150.9 $\pm$ 15.5 (11)	144.5 $\pm$ 25.1 (11)	164.0 $\pm$ 23.4 (12)	161.0 $\pm$ 24.4 (13)
<u>Days of lactation</u>				
0-4	33.4 $\pm$ 23.0 (11)	18.4 $\pm$ 30.3 (10)	27.6 $\pm$ 13.0 (12)	22.9 $\pm$ 15.4 (13)

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 9

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Food consumption of males (g), Mean $\pm$ S.D.(N)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
<u>Days of treatment</u>				
1-2	30.9 $\pm$ 3.4 (13)	32.9 $\pm$ 1.4 (13)	31.4 $\pm$ 3.0 (13)	30.9 $\pm$ 3.1 (13)
7-8	30.0 $\pm$ 3.1 (13)	30.9 $\pm$ 3.1 (13)	30.6 $\pm$ 2.1 (13)	31.7 $\pm$ 3.0 (13)
13-14	29.1 $\pm$ 3.7 (13)	29.2 $\pm$ 3.4 (13)	29.0 $\pm$ 3.2 (13)	30.3 $\pm$ 4.3 (13)
29-30	30.5 $\pm$ 2.8 (13)	30.6 $\pm$ 2.7 (13)	30.0 $\pm$ 2.7 (13)	32.8 $\pm$ 3.5 (13)
35-36	30.3 $\pm$ 2.6 (13)	31.6 $\pm$ 2.3 (13)	29.5 $\pm$ 3.4 (13)	33.3 $\pm$ 3.3 (13) *
41-42	31.0 $\pm$ 2.8 (13)	29.6 $\pm$ 2.2 (13)	29.8 $\pm$ 4.1 (13)	33.4 $\pm$ 2.5 (13)

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 10

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Food consumption of females (g), Mean $\pm$ S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
<u>Days of treatment</u>				
1-2	21.3 $\pm$ 3.8 (13)	21.9 $\pm$ 3.8 (13)	20.4 $\pm$ 2.9 (13)	21.2 $\pm$ 2.4 (13)
7-8	21.9 $\pm$ 2.4 (13)	20.1 $\pm$ 2.3 (13)	20.7 $\pm$ 2.2 (13)	20.6 $\pm$ 2.2 (13)
13-14	21.1 $\pm$ 2.8 (13)	21.4 $\pm$ 3.0 (13)	21.3 $\pm$ 3.3 (13)	22.3 $\pm$ 3.0 (13)
<u>Days of pregnancy</u>				
0-1	21.1 $\pm$ 2.8 (11)	22.0 $\pm$ 3.4 (11)	23.5 $\pm$ 4.7 (12)	21.4 $\pm$ 2.7 (13)
7-8	28.4 $\pm$ 2.8 (11)	28.9 $\pm$ 4.8 (11)	29.5 $\pm$ 4.1 (12)	29.5 $\pm$ 2.6 (13)
14-15	27.2 $\pm$ 3.2 (11)	28.0 $\pm$ 3.3 (11)	29.3 $\pm$ 3.3 (12)	28.1 $\pm$ 2.8 (13)
20-21	20.2 $\pm$ 5.2 (11)	21.2 $\pm$ 5.6 (11)	20.3 $\pm$ 8.2 (12)	27.1 $\pm$ 7.4 (13) *
<u>Days of lactation</u>				
3-4	42.5 $\pm$ 4.8 (11)	40.8 $\pm$ 10.1 (10)	46.7 $\pm$ 6.5 (12)	47.9 $\pm$ 5.5 (13)

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 11

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Organ weight of males, Mean $\pm$ S.D.

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Number of males examined	13	13	13	13
Terminal body weight (g)	525.8 $\pm$ 41.9	536.3 $\pm$ 32.5	528.8 $\pm$ 44.6	532.8 $\pm$ 41.2
Testes (g)	3.17 $\pm$ 0.60 ^{b)}	3.42 $\pm$ 0.22	3.29 $\pm$ 0.26	3.19 $\pm$ 0.58
	0.61 $\pm$ 0.12 ^{c)}	0.64 $\pm$ 0.05	0.62 $\pm$ 0.05	0.60 $\pm$ 0.12
Epididymides (g)	1.19 $\pm$ 0.17	1.33 $\pm$ 0.14	1.27 $\pm$ 0.09	1.25 $\pm$ 0.18
	0.23 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.04

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

b) absolute weight

c) relative weight (g or mg per 100g body weight)

Table 12

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Organ weight of females, Mean $\pm$ S.D.

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Number of dams examined	11	10	12	13
Terminal body weight (g)	345.1 $\pm$ 20.9	335.5 $\pm$ 24.6	348.7 $\pm$ 26.7	354.6 $\pm$ 15.9
Ovaries (mg)	106.7 $\pm$ 11.6 ^{b)}	102.1 $\pm$ 14.6	105.5 $\pm$ 10.0	110.5 $\pm$ 14.3
	30.9 $\pm$ 2.8 ^{c)}	30.6 $\pm$ 4.7	30.4 $\pm$ 3.4	31.2 $\pm$ 3.7

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

b) absolute weight

c) relative weight (g or mg per 100g body weight)

Table 13

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Macroscopic findings in males

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}		100		300		1000	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Testis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small, bilateral	12	1	12	1	13	0	12	1
Edematous, bilateral	12	1	13	0	13	0	13	0
(Epididymis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small, bilateral	12	1	13	0	13	0	11	2
Nodule, yellowish white, bilateral	13	0	12	1	13	0	13	0
Nodule, yellowish white, right side	13	0	13	0	13	0	12	1
(Stomach)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Thickening, mucosa, forestomach	13	0	13	0	13	0	2	11
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement, right side	13	0	13	0	13	0	12	1
Absence, left side	13	0	13	0	13	0	12	1

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 14

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats

Macroscopic findings in females (Subjected to autopsy on day 5 of lactation)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}		100		300		1000	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Uterus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Remnant of a fetus	13	0	12	1	13	0	13	0
(Stomach)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Thickening, mucosa, forestomach	13	0	13	0	13	0	11	2

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 15

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Histopathological findings in males

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}					Pos.	100					Pos.	300					Pos.	1000					Pos.
Grade	-	±	+	2+	3+		-	±	+	2+	3+		-	±	+	2+	3+		-	±	+	2+	3+	
(Testis)	[13]						[1]						[0]						[13]					
Atrophy, seminiferous tubule, bilateral	11	1	0	1	0	2	0	1	0	0	0	1							11	1	0	1	0	2
Atrophy, seminiferous tubule, unilateral	11	2	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0							12	1	0	0	0	1
Multinucleated giant cell, seminiferous tubule	13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0							12	0	1	0	0	1
Hyperplasia, Leydig cell, diffuse, bilateral	12	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0							12	0	1	0	0	1
(Epididymis)	[13]						[1]						[0]						[13]					
Decrease, sperm, lumen, bilateral	12	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0							12	0	0	1	0	1
Cell debris, lumen, bilateral	11	1	0	1	0	2	0	1	0	0	0	1							11	1	0	1	0	2
Cell debris, lumen, unilateral	11	2	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0							11	2	0	0	0	2
Spermatic granuloma, bilateral	13	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1							13	0	0	0	0	0
Spermatic granuloma, unilateral	13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0							11	0	2	0	0	2
(Stomach)	[0]						[0]						[0]						[11]					
Hyperplasia, diffuse, squamous cell, mucosa, forestomach																			0	11	0	0	0	11
(Kidney)	[0]						[0]						[0]						[1]					
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium, cortex																			0	0	1	0	0	1
Basophilic tubule, cortex																			0	1	0	0	0	1

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; 2+, Moderate; 3+, Marked; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 16

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
 Histopathological findings in females (Subjected to autopsy on day 5 of lactation)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}						100						300						1000					
Grade	-	±	+	2+	3+	Pos.	-	±	+	2+	3+	Pos.	-	±	+	2+	3+	Pos.	-	±	+	2+	3+	Pos.
(Ovary)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Follicular cyst, unilateral	12	0	1	0	0	1													12	1	0	0	0	1
(Stomach)	[0]						[0]						[0]						[2]					
Hyperplasia, diffuse, squamous cell, mucosa, forestomach																			0	0	2	0	0	2

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; 2+, Moderate; 3+, Marked; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 17

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats

Results of observations about estrus cycle

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Number of animals examined	13	13	13	13
<u>Pre-treatment period</u>				
Number of animals showing type of cycle				
4-day cycle	11	7	12	10
4 and 5-day cycle	2	0	1	1
5-day cycle	0	5	0	2
Irregular	0	1	0	0
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D. (N)	4.1 ± 0.2 (13)	4.3 ± 0.6 (13)	4.0 ± 0.1 (13)	4.2 ± 0.4 (13)
<u>Treatment period</u>				
Number of animals showing each type of cycle				
4-day cycle	9	7	12	11
4 and 5-day cycle	1	3	0	0
5-day cycle	0	2	0	2
Irregular	3	1	1	0
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D. (N)	4.2 ± 0.4 (13)	4.4 ± 0.6 (13)	4.0 ± 0.0 (13)	4.2 ± 0.4 (13)
Frequency of animals of which type of estrus cycle was changed after the treatment	3 / 13	6 / 13	2 / 13	1 / 13
Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean±S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (13)	1.0 ± 0.0 (12)	1.0 ± 0.0 (13)	1.0 ± 0.0 (13)

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 18

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Results of observations about reproductive performance

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Number of mated pairs [A]	13	13	13	13
Number of copulated pairs [B]	13	12	13	13
Copulation index [(B/A)×100,%]	100.0	92.3	100.0	100.0
Number of fertile males [C]	11	11	12	13
Fertility index [(C/B)×100,%]	84.6	91.7	92.3	100.0
Pairing days until copulation ; Mean±S.D.	2.2 ± 1.2	2.3 ± 1.1	2.4 ± 1.1	2.1 ± 1.0

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 19

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Development of pups up to day 4 of lactation, Mean±S.D.

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Number of pregnant females	11	11	12	13
Number of pregnant females with live pups	11	10	12	13
Delivery index (dams, %)	100.0	90.9	100.0	100.0
Gestation length; days	22.5 ± 0.5 (11)	22.8 ± 0.6 (10)	22.3 ± 0.5 (12)	22.2 ± 0.4 (13)
Number of corpora lutea	15.9 ± 1.4 (11)	15.9 ± 2.8 (11)	17.8 ± 2.8 (12)	17.7 ± 1.8 (13)
Number of implantations	15.3 ± 1.6 (11)	13.2 ± 4.9 (11)	16.0 ± 3.0 (12)	16.5 ± 2.2 (13)
Implantations index	95.9 ± 4.6 (11)	80.8 ± 27.7 (11)	90.2 ± 14.6 (12)	93.0 ± 7.1 (13)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	14.0 ± 2.1 (11)	12.7 ± 2.9 (10)	15.0 ± 3.1 (12)	15.2 ± 2.0 (13)
Delivery index (pups)	91.4 ± 8.0 (11)	89.1 ± 13.2 (10)	93.9 ± 7.9 (12)	92.9 ± 8.5 (13)
Number of live pups				
Males	6.4 ± 2.3 (11)	7.1 ± 2.9 (10)	7.8 ± 2.4 (12)	8.5 ± 3.4 (13)
Females	7.2 ± 1.7 (11)	5.4 ± 2.3 (10)	6.4 ± 2.8 (12)	6.3 ± 2.4 (13)
Total	13.5 ± 1.8 (11)	12.5 ± 3.1 (10)	14.2 ± 3.0 (12)	14.8 ± 2.2 (13)
Sex ratio on day 0	46.0 ± 15.8 (11)	56.1 ± 17.7 (10)	55.9 ± 15.4 (12)	56.3 ± 18.5 (13)
Birth index	88.7 ± 8.5 (11)	87.2 ± 12.5 (10)	89.0 ± 11.0 (12)	90.8 ± 11.2 (13)
Live birth index	97.2 ± 5.8 (11)	98.0 ± 4.3 (10)	94.8 ± 8.4 (12)	97.4 ± 5.1 (13)
Day 4 of lactation				
Number of live pups				
Males	6.3 ± 2.2 (11)	6.9 ± 2.9 (10)	7.6 ± 2.5 (12)	8.5 ± 3.4 (13)
Females	7.1 ± 1.6 (11)	5.4 ± 2.3 (10)	6.3 ± 2.9 (12)	6.1 ± 2.2 (13)
Total	13.4 ± 1.7 (11)	12.3 ± 2.9 (10)	13.8 ± 3.2 (12)	14.5 ± 2.4 (13)
Sex ratio on day 4	46.0 ± 15.4 (11)	55.2 ± 18.5 (10)	56.0 ± 15.4 (12)	56.8 ± 17.8 (13)
Viability index				
Males	99.1 ± 3.0 (11)	96.6 ± 8.1 (10)	97.6 ± 5.6 (12)	99.0 ± 3.5 (13)
Females	99.0 ± 3.3 (11)	100.0 ± 0.0 (10)	97.4 ± 6.1 (12)	97.2 ± 7.3 (13)
Total	98.8 ± 2.7 (11)	98.5 ± 3.2 (10)	97.5 ± 5.8 (12)	97.7 ± 5.0 (13)

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

Parenthesis indicates number of dams.

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Delivery index (dams) = (number of pregnant females with live pups / number of pregnant females) × 100, %

Delivery index (pups) = (number of pups born / number of implantations) × 100, %

Birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantations) × 100, %

Live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born) × 100, %

Sex ratio = (number of male live pups / number of live pups) × 100, %

Viability index on day 4 of lactation = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 0) × 100, %

Table 20

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats

Body weight of pups, Mean $\pm$ S.D. (N)

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Day 0				
No. of live pups (male/female)	70 / 79	71 / 54	93 / 77	111 / 82
Male	6.4 $\pm$ 2.3 (11)	7.1 $\pm$ 2.9 (10)	7.8 $\pm$ 2.4 (12)	8.5 $\pm$ 3.4 (13)
Female	7.2 $\pm$ 1.7 (11)	5.4 $\pm$ 2.3 (10)	6.4 $\pm$ 2.8 (12)	6.3 $\pm$ 2.4 (13)
Litter weight(g); Male	42.5 $\pm$ 14.4 (11)	49.3 $\pm$ 18.9 (10)	51.4 $\pm$ 15.2 (12)	55.6 $\pm$ 20.2 (13)
Female	46.2 $\pm$ 12.1 (11)	35.4 $\pm$ 14.0 (10)	39.8 $\pm$ 17.2 (12)	39.7 $\pm$ 15.5 (13)
Body weight (g); Male	6.9 $\pm$ 0.8 (11)	7.1 $\pm$ 0.6 (10)	6.7 $\pm$ 0.9 (12)	6.6 $\pm$ 0.5 (13)
Female	6.4 $\pm$ 0.6 (11)	6.6 $\pm$ 0.6 (10)	6.4 $\pm$ 0.9 (12)	6.3 $\pm$ 0.5 (13)
Day 4				
No. of live pups (male/female)	69 / 78	69 / 54	91 / 75	110 / 79
Male	6.3 $\pm$ 2.2 (11)	6.9 $\pm$ 2.9 (10)	7.6 $\pm$ 2.5 (12)	8.5 $\pm$ 3.4 (13)
Female	7.1 $\pm$ 1.6 (11)	5.4 $\pm$ 2.3 (10)	6.3 $\pm$ 2.9 (12)	6.1 $\pm$ 2.2 (13)
Litter weight(g); Male	65.6 $\pm$ 20.8 (11)	76.5 $\pm$ 29.4 (10)	84.0 $\pm$ 23.9 (12)	86.3 $\pm$ 27.9 (13)
Female	73.6 $\pm$ 22.0 (11)	57.0 $\pm$ 21.9 (10)	64.3 $\pm$ 27.2 (12)	62.6 $\pm$ 25.3 (13)
Body weight (g); Male	10.9 $\pm$ 1.7 (11)	11.4 $\pm$ 1.8 (10)	11.4 $\pm$ 2.1 (12)	10.6 $\pm$ 1.3 (13)
Female	10.3 $\pm$ 1.5 (11)	10.8 $\pm$ 1.6 (10)	10.7 $\pm$ 2.2 (12)	10.2 $\pm$ 1.3 (13)

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

a) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

Table 21

Reproduction/developmental toxicity screening test of 1,3-benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, monosodium salt by oral administration in rats
Morphological findings of pups

Dose (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Dead pups				
Number of dead pups ^{b)}	7	4	14	9
Number of missing pups	2	3	2	4
Number of dead pups examined	5 (5) ^{c)}	1 (1)	12 (3)	5 (2)
Number of dead pups with external changes	0	0	0	0
Number of dead pups with visceral changes			0	0
Live pups				
Number of live pups examined (postnatal day 0)	149	125	170	193
Number of live pups with external changes	0	0	0	0

Number of live pups examined (postnatal day 4)	147	123	166	189
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) vehicle control, water for injection (5 mL/kg)

b) including missing pups

c) parenthesis indicates number of dead pups with rotten internal organ