

---

2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-3) のラットにおける  
経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

---

最 終 報 告 書

株式会社日本バイオリサーチセンター  
羽島研究所

NBR-1

# 目 次

|                                       | 頁  |
|---------------------------------------|----|
| 要 約 .....                             | 1  |
| 緒 言 .....                             | 3  |
| 試験材料および試験方法                           |    |
| 1. 被験物質および媒体 .....                    | 3  |
| 2. 投与検体および濃度確認 .....                  | 3  |
| 3. 使用動物および飼育条件 .....                  | 4  |
| 4. 投与経路、投与方法、群構成、投与量および投与期間 ..        | 5  |
| 5. 観察および検査項目 .....                    | 6  |
| 6. 統計学的方法 .....                       | 9  |
| 試験成績                                  |    |
| I. 反復投与毒性                             |    |
| 1. 雄 (P) に及ぼす影響 .....                 | 10 |
| 2. 雌 (P) に及ぼす影響 .....                 | 11 |
| II. 生殖発生毒性                            |    |
| 1. 親動物 (P) の生殖発生に及ぼす影響 .....          | 13 |
| 2. 新生児 (F <sub>1</sub> ) に及ぼす影響 ..... | 14 |
| 考 察 .....                             | 15 |
| 資 料 .....                             | 16 |
| Table (1-1~18) .....                  | 20 |
| Fig. (1~5) .....                      | 45 |

|               |                                                                                                                                                                                                                        |       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Table 1-1~1-2 | General sign of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                        | 20~21 |
| Table 2       | Body weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                         | 22    |
| Table 3       | Food consumption of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                    | 23    |
| Table 4       | Hematological finding of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                               | 24    |
| Table 5       | Blood chemical analysis of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                             | 25    |
| Table 6       | Necropsy finding of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                    | 26    |
| Table 7       | Organ weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                        | 27    |
| Table 8       | Histopathological finding of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                           | 28    |
| Table 9-1     | General sign of female rats (P) during pre-mating and mating periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration ..... | 29    |

|            |                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 9-2  | General sign of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                 | 30 |
| Table 9-3  | General sign of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                 | 31 |
| Table 10-1 | Body weight of female rats (P) during pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                          | 32 |
| Table 10-2 | Body weight of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                  | 33 |
| Table 10-3 | Body weight of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                  | 34 |
| Table 11-1 | Food consumption of female rats (P) during pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration ..                        | 35 |
| Table 11-2 | Food consumption of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                             | 36 |
| Table 11-3 | Food consumption of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                             | 37 |
| Table 12   | Necropsy finding of dams (P) on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                               | 38 |
| Table 13   | Organ weight of dams (P) on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                   | 39 |
| Table 14   | Histopathological finding of dams (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                            | 40 |
| Table 15   | Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration ..... | 41 |

|          |                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 16 | Observation of pups (F1) in combined repeat dose and reproductive/<br>developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic<br>Acid by oral administration .....                                              | 42 |
| Table 17 | Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in combined<br>repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of<br>2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                  | 43 |
| Table 18 | Necropsy finding of pups (F1) on day 4 of lactation in combined<br>repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of<br>2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                    | 44 |
| Fig. 1   | Body weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/<br>developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic<br>Acid by oral administration .....                                          | 45 |
| Fig. 2   | Food consumption of male rats (P) in combined repeat dose and<br>reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-<br>naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                                     | 46 |
| Fig. 3-1 | Body weight of female rats (P) during pre-mating period in combined<br>repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of<br>2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                | 47 |
| Fig. 3-2 | Body weight of dams (P) during pregnancy and lactation periods in<br>combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening<br>test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration ...           | 48 |
| Fig. 4-1 | Food consumption of female rats (P) during pre-mating period in<br>combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening<br>test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration ..              | 49 |
| Fig. 4-2 | Food consumption of dams (P) during pregnancy and lactation periods<br>in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity<br>screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral<br>administration ..... | 50 |
| Fig. 5   | Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in combined<br>repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of<br>2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration .....                  | 51 |

2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸のラットにおける経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する反復投与による一般毒性学的な影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検討した。投与段階は、8、40、200 および 1000 mg/kgとした。

## I. 反復投与毒性

### 1. 雄（P）に及ぼす影響

一般状態：1000 mg/kg 群では、投与期間の初期から最終投与日まで少数例～全例で投与後に流涎がみられたが、投与後約 10 分には消失した。

体重：各投与群とも対照群との間に差は認められなかった。

摂餌量：各投与群とも被験物質投与の影響はみられなかった。

血液学的検査：各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかった。

血液化学的検査：各投与群とも被験物質投与の影響はみられなかった。

剖検所見：各投与群とも著変はみられなかった。

器官重量：1000 mg/kg 群では、肝臓の絶対重量および相対重量がともに有意な低値を示した。

病理組織学的検査：1000 mg/kg 群では、心臓、腎臓、肝臓、胸腺、精巣、精巣上体、副腎、脳および脾臓には被験物質投与に起因すると思われる組織変化はみられなかった。

### 2. 雌（P）に及ぼす影響

一般状態：1000 mg/kg 群では、交配開始前の中期以降および交配期間中、妊娠期間中および哺育期間には最終投与日まで、少数例～全例で投与後に流涎がみられたが、投与後約 10 分には消失した。

体重：各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかった。

摂餌量：各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかった。

剖検所見：各投与群とも著変はみられなかった。

器官重量：各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかった。

病理組織学的検査：1000 mg/kg 群では、心臓、腎臓、肝臓、胸腺、卵巣、副腎、脳および脾臓には被験物質投与に起因すると思われる組織変化はみられなかった。

## II. 生殖発生毒性

### 1. 親動物（P）の生殖発生に及ぼす影響

発情回数、交尾率、交尾日数：各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。

受胎雌数、妊娠期間：各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。また、分娩状態に異常はみられなかった。

受胎率：対照群および各投与群とも 100 %であった。

黄体数、着床痕数、着床率：各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。

出産率：各投与群とも被験物質投与の影響はみられなかった。

## 2. 新生児 (F<sub>1</sub>) に及ぼす影響

総出産児数、分娩率、哺育 0 日の新生児数：各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。

死産児数、出生率：用量依存性の変動はみられなかった。

性比：各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。

一般状態：対照群および各投与群とも異常症状はみられなかった。

哺育 4 日の新生児数：用量依存性の変動はみられなかった。

哺育 4 日の生存率：各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。

外表観察：各投与群とも被験物質投与の影響はみられなかった。

体重：各投与群の雌雄とも、新生児の体重は哺育 0 日および哺育 4 日ともに対照群とほぼ同程度であった。

以上の結果、2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸は 1000 mg/kg で雌雄 (P) の一般状態 (流涎) および雄 (P) の器官 (肝臓) 重量に影響がみられた。したがって、当試験条件下における一般毒性学的な無影響量は雌雄とも 200 mg/kg と推察された。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄の生殖および児動物の発生に関していずれも 1000 mg/kg と推察された。

2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-3) が人に継続的に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD 毒性試験ガイドライン<sup>1)</sup>に従って 2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸を雌雄ラットに 1 日 1 回、41～49 日間経口投与した反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する反復投与による一般毒性学的な影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検討した。

## 試験材料および試験方法

### 1. 被験物質および媒体

被験物質の 2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-3) は、黄みの白ないしごくうすい赤の固体で、分子量：223.25、直射日光下では急速に着色し、水に難溶であるが、炭酸水素ナトリウム溶液に対する溶解状態は澄明ないしわずかに微濁する性質を有する。当試験には、平成 5 年 8 月 18 日に 規格値：  
から提供されたものを用いた (Lot No. 98.0 % 以上、純度：98.7 %)。入手後は少量ずつ分割し、室温・遮光・気密条件下で試験施設の被験物質保管室の保管庫に保管した。なお、投与終了後に残余被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、純度は 98.9 % であり、使用期間中の安定性が確認された。

媒体として、0.5 %カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を用いた。カルボキシメチルセルロースナトリウム (以下 CMC、Lot No. 2407、丸石製薬株式会社、平成 4 年 7 月 16 日購入) は、入手後は試験施設の被験物質保管室に室温で保管した。

### 2. 投与検体および濃度確認

被験物質を秤取し、注射用水 (Lot No. 3E00N、株式会社大塚製薬工場、使用期限：1998 年 4 月) によって 0.5 % 溶液とした CMC に懸濁して必要濃度の投与検体液を調製した。なお、被験物質は純度換算しないで原体重量で表示した。

投与開始前および投与期間終了前の 2 回、試験施設内において高速液体クロマトグラフィーにより各投与検体液中の被験物質濃度を測定した。その結果、被験物質濃度は表示濃



度の 98.7~101.5 % であり、設定した適正範囲（表示濃度の ± 10 %）内の値を示した（Attached table 1、2）。

0.5 % CMC 溶液中の 1.6、20 および 200 mg/ml 濃度の被験物質は、調製後冷蔵・遮光下で 7 日間、さらに室温・遮光下で 4 時間の保存条件において安定であることが確認されている（Attached table 3）。そこで、投与検体液の調製は 1 週間に 1 回以上とし、1 日分ずつ分割して冷蔵・遮光下で保存し、用時室温に戻して投与に使用した。なお、投与後の残余検体液は廃棄した。

### 3. 使用動物および飼育条件

#### 1) 動物種および系統

試験には、一般毒性試験および生殖・発生毒性試験に汎用され、自然発生奇形等の成績に関する知見が多く得られている Sprague-Dawley 系雌雄ラット [ (SPF)、Crj: CD (SD) ] を用いた。ラットは、平成 5 年 12 月 28 日に日本チャールス・リバー株式会社（日野飼育センター）から 8 週齢で雌雄各 73 匹を購入した。入手後 2 日の体重範囲は、雄で 287~323 g、雌で 183~214 g であった。

#### 2) 検疫および馴化、群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は、5 日間の検疫期間およびその後 7 日間の馴化期間を設けた。この間に、3 回の体重測定および毎日一般状態の観察を、さらに雌は馴化期間中に 7 日間の性周期観察を行った。一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けして試験に用いた。

群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように、投与開始日の前日に行った。群分け後の残余動物は、初回投与日にエーテル麻酔致死させた後に廃棄処分した。

動物は、検疫・馴化期間中は動物入手日に油性インクおよび色素による染毛法を用いて、群分け後は色素による染毛法および耳パンチ法を併用して識別した。さらに、検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号、入手年月日、性別および馴化動物番号を記入したラベルを、群分け後の各ケージには試験番号、投与量、性別および動物番号を記入し、群毎に色分けしたラベルを取り付けた。

#### 3) 環境条件および飼育管理

動物は、室温 20~24 °C、湿度 40~70 %、明暗各 12 時間（照明：午前 6 時~午後 6 時）、換気回数 12 回/時（フィルターにより除菌した新鮮空気）に設定した飼育室（E 棟 7 号室）で飼育した。

検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージ（W: 240 x D: 380 x H: 200 mm）を用いて 1 ケージあたり 5 匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージ（W: 755

x D: 210 x H: 170 mm) を用いて個別飼育した。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。また、母動物は妊娠 18 日にオートクレーブ処理した床敷 (サンフレーク、日本チャールス・リバー株式会社) を入れたプラスチック製ケージ (W: 310 x D: 360 x H: 175 mm) に個別に移し、自然分娩および哺育させた。ケージの受け皿、給水瓶およびプラスチック製ケージの交換は 1 週間に 2 回以上行い、ステンレス製懸垂式ケージ・五連ケージおよび給餌器の交換は 2 週間に 1 回以上行った。なお、動物飼育室の清掃 (床の掃き掃除) および 500 倍希釈次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った。

床敷の微量金属および汚染物質の分析結果は、ほぼ半年毎に財団法人日本食品分析センターで実施した成績を、日本チャールス・リバー株式会社から入手した。その結果、分析成績は当試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

#### 4) 飼料および飲料水

飼料は、入手後 3 カ月以内の固型飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社) を給餌器に入れ、自由に摂取させた。飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社から入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ 3 カ月毎に財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した。

飼料および飲料水の検査の結果、いずれも検査結果は当試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

### 4. 投与経路、投与方法、群構成、投与量および投与期間

#### 1) 投与経路および投与方法

2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸は、継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。

投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたプラスチック製ディスプレイ注射筒を用いて強制経口投与した。投与液量は、雄では投与日に最も近い測定時の体重を基準とし、5 ml/kg で算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日に最も近い測定時の体重を、妊娠期間中は妊娠 0、7、14 および 21 日の体重を、授乳期間中は哺育 0 日の体重を基準とし、5 ml/kg で算出した。投与回数は 1 日 1 回とした。投与時刻は、午前 9 時 10 分～12 時 12 分の間であった。投与開始時の体重範囲は、雄が 349～394 g、雌が 209～239 g であった。

#### 2) 群構成および投与量

群構成は、以下の表の如くとした。一群の動物数は、雌雄各 12 匹とした。

投与量設定の理由：投与量設定のための、雄ラットを用いた 2 週間投与による予備試験

(投与段階：0、30、100、300 および 1000 mg/kg) の結果、最高用量の 1000 mg/kg群でも死亡発現はなく、一般状態、体重推移および剖検に異常はみられなかった<sup>2)</sup>。

そこで、当試験では OECD 毒性試験ガイドラインで限界用量とされている 1000 mg/kgを最高用量として、以下公比 5 により 200、40 および 8 mg/kg群を設定した。なお、対照として媒体の 0.5 % CMC を同容量投与する群を設けた。

| 群     | 試 験 群              | 投与量 (濃度)          | 雄 (動物番号)     | 雌 (動物番号)     |
|-------|--------------------|-------------------|--------------|--------------|
| 第 1 群 | 対照 (0.5 % CMC)     | 0 mg/kg ( 0 %)    | 12 (001~012) | 12 (051~062) |
| 第 2 群 | 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸 | 8 mg/kg ( 0.16 %) | 12 (101~112) | 12 (151~162) |
| 第 3 群 | 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸 | 40 mg/kg ( 0.8 %) | 12 (201~212) | 12 (251~262) |
| 第 4 群 | 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸 | 200 mg/kg ( 4 %)  | 12 (301~312) | 12 (351~362) |
| 第 5 群 | 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸 | 1000 mg/kg (20 %) | 12 (401~412) | 12 (451~462) |

### 3) 投与期間

投与期間は、OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS、Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test に従って、雄では交配前 14 日間とその後 35 日間の合計 49 日間とし、雌では交配前 14 日間、交配期間中 (最長 8 日間)、妊娠期間および哺育 4 日の剖検前日までの合計 41~48 日間とした。

## 5. 観察および検査項目

### 1) 雄 (P)

#### (1) 一般状態および死亡の有無

一般状態および死亡の有無を、投与期間中は毎日投与前・後の 2 回 (ただし、剖検日は剖検前 1 回) 観察した。

#### (2) 体重測定

体重は、毎週 2 回 (投与初日を 1 日とし、投与 1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、43、46 日) および剖検日 (50 日) に測定した。

#### (3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前 14 日間および交配期間終了後から毎週 2 回、連続 2 日間量を測定し、1 日量に換算した。なお、測定開始日に給餌量を、終了日には残量を測定し、摂餌量の表示は残量の測定日 (3、6、10、13、27、31、34、38、41、45、48 日) とした。また、剖検前日の夕刻 (ほぼ午後 3 時) からは絶食とした。

#### (4) 血液学的検査

投与期間 (49 日間) 終了の翌日に、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与 (約 40 mg/kg) による麻酔下で腹大動脈からカニュレーションにより血液を採取し、以下の検査を行った。なお、検査後の残余血液は廃棄した。

プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) およびフィブリノーゲン濃度は、3.13 % クエン酸ナトリウム処理した血漿について、散乱光検出方式によりコアグマスター II (三共株式会社) を用いて測定した。

赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、白血球数 (WBC) および血小板数は、EDTA-2K コーティングした Sysmex サンプルカップに採取した血液について、多項目自動血球計数装置 (Sysmex E-2000、東亜医用電子株式会社) を用いて測定した。さらに、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH) および平均赤血球血色素濃度 (MCHC) を算出した。

白血球百分率は、EDTA-2K 処理した血液をスライドグラスに塗抹後、May-Giemsa 染色した標本を作製して顕微鏡下で白血球 100 個を分類計数した。

網状赤血球数 (RET) は、EDTA-2K 処理した血液を Brecher 法により超生体染色してスライドグラスに塗抹後、Giemsa 染色した標本を作製して顕微鏡下で赤血球 1000 個中の数を計数した。

#### (5) 血液化学的検査

血液学的検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液から分離 (約 4 °C、3000 rpm、15 分間) して得た血清について、以下の検査を行った。なお、血清は測定時まで冷凍庫 (-80 °C) 内に保管し、測定後は最終報告書提出時まで冷凍庫 (-20 °C) 内に保管して、その後廃棄する。

GOT および GPT は Henry 変法、 $\gamma$ -GTP (GGT) は  $\gamma$ -G-P-NA 基質法、総蛋白 (TP) は Biuret 法、尿素窒素 (BUN) は Urease-GLDH 法、クレアチニンは Jaffé 法、総ビリルビン (T-BIL) は Azobilirubin 法、ブドウ糖は Glucose dehydrogenase 法、無機リン (IP) は Molybdenum blue 法、カルシウム (Ca) は o-CPC 法により、いずれも自動分析装置 (AU 500、オリンパス光学工業株式会社) を用いて測定した。

Na および K はイオン選択電極法により、Cl は電量滴定法により、いずれも全自動電解質分析装置 (EA04、株式会社 A & T) を用いて測定した。

アルブミン量は、総蛋白値および蛋白分画値 (自動電気泳動装置 AES 600、オリンパス光学工業株式会社) から算出した。

#### (6) 剖 検

上記の (4) および (5) で採血した動物をさらに放血致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。肝臓、腎臓、胸腺、精巣および精巣上体を摘出後に重量を測定し、さらに副腎、脳、心臓および脾臓を摘出した。その後、精巣および精巣上体はブアン液で固定後 10 % 中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。その他の器官・組織は、10 % 中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

#### (7) 病理組織学的検査

固定した全例の各器官および組織について、常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および 1000 mg/kg 群については H-E 染色組織標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

## 2) 雌 (P)

### (1) 一般状態および死亡の有無

一般状態および死亡の有無を、投与期間中は毎日投与前・後の 2 回 (ただし、剖検日は剖検前 1 回) 観察した。

### (2) 性周期

性周期を、投与開始日から交尾確認日まで毎日 1 回観察した。なお、発情期が連続 2 日間にわたって観察される場合は 1 回と計数した。

### (3) 体重測定

体重を、交配開始前 14 日間および交配期間中は毎週 2 回 (投与初日を 1 日とし、投与 1、4、8、11、15、18 および 22 日)、妊娠期間中は妊娠 0、7、14 および 21 日に、哺育期間は哺育 0 および 4 日にそれぞれ測定した。

### (4) 摂餌量測定

摂餌量を、交配開始前 14 日間までは毎週 2 回、連続 2 日間量を測定 (3、6、10 および 13 日) して 1 日量に換算した。また、妊娠期間中は妊娠 0、7、14 および 19 日からの連続 2 日間量を、哺育期間中は哺育 0~4 日の累積量を測定し、それぞれ 1 日量に換算した。なお、測定開始日には給餌量を、終了日には残量を測定し、摂餌量の表示は残量の測定日とした。

### (5) 分娩状態の観察

母動物は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠 21 日から妊娠 25 日の午前 10 時まで毎日行った。午前 10 時に分娩が終了していた場合、その日を哺育 0 日とした。

### (6) 妊娠 25 日の午前 10 時までに分娩しない動物

該当動物は認められなかった。

### (7) 哺育状態の観察および剖検

哺育状態を哺育 4 日まで毎日観察し、哺育 4 日にエーテル麻酔下で腹大動脈の切断により放血致死させた後に剖検し、着床痕数および黄体数を数えた。肝臓、腎臓、胸腺および卵巣を摘出後に重量を測定し、副腎、脳、心臓および脾臓とともに 10 % 中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

### (8) 全新生児が死亡した母動物

全新生児が死亡した母動物 (死産児のみの場合を含む) は、発見後速やかにエーテル麻酔下で腹大動脈の切断により放血致死させた後に剖検し、着床痕数および黄体数を数えた。肝臓、腎臓、胸腺および卵巣を摘出後に重量を測定し、副腎、脳、心臓および脾臓とともに 10 % 中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

### (9) 病理組織学的検査

固定した全例の各器官および組織について、常法に従ってパラフィン包埋標本作製した。対照群および 1000 mg/kg 群については H-E 染色組織標本作製し、病理組織学的検査を行った。

### 3) 親動物 (P) の生殖発生に及ぼす影響

14 日間にわたって被験物質を投与し、約 12 週齢の同一群内の雌雄を 1 対 1 の組み合わせで、同居交配した。交配期間は 14 日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配としたが、同居開始後 8 日までに全例の交尾が確認された。

なお、交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、膣垢内に精子または膣栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠 0 日として起算した。

### 4) 新生児 ( $F_1$ )

#### (1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。死産児は、10 %中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

#### (2) 新生児の観察

新生児は、一般状態および死亡の有無を生存期間中毎日 1 回観察した。死亡児は、剖検後 10 %中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。

#### (3) 体 重

体重を、哺育 0 (出生日) および 4 日に測定した。

#### (4) 剖 検

哺育 4 日の観察終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈の切断により放血致死させた後、剖検した。

## 6. 統計学的方法

測定値の統計学的方法は下記の検定法を用い、有意差検定は対照群と 2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の各投与群との間で行った。いずれの検定の場合も危険率 5 %未満を有意とし、5 %未満 ( $p < 0.05$ ) と 1 %未満 ( $p < 0.01$ ) とに分けて表示した。なお、新生児は一腹の平均を一単位とした。

### 1) 多重比較検定

Bartlett 法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならば対照群との群間比較は Dunnett 法 (例数が等しい場合) または Scheffé 法 (例数が等しくない場合) により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析 (Kruskal-Wallis の検定) を行い、有意ならば対照群との群間比較は順位を利用した Dunnett 法 (例数が等しい場合) または Scheffé 法 (例数が等しくない場合) を用いて行った。

体重 (親動物、新生児)、摂餌量、発情回数、同居日数、妊娠期間 = [分娩日 (哺育 0 日) - 交尾確認日]、着床痕数、総出産児数 = (新生児数 + 死産児数)、新生児数、死産児数、分娩率 = [(総出産児数 / 着床痕数)  $\times$  100]、児の産出率 = [(哺育 0 日の新生

児数／着床痕数) x 100]、黄体数、着床率 = [(着床痕数／黄体数) x 100]、出生率 = [(哺育 0 日の新生児数／総出産児数) x 100]、哺育 4 日の生存率 = [(哺育 4 日の新生児数／哺育 0 日の新生児数) x 100]、外表異常出現率 = [(外表異常児数／新生児数) x 100]、性比 = (雄／雄 + 雌)、器官重量 (相対重量を含む)、血液学的検査成績、血液化学的検査成績。

## 2) カイ二乗検定

交尾率 = [(交尾成立動物数／同居動物数) x 100]、受胎率 = [(受胎雌数／交尾成立動物数) x 100]、出産率 = [(新生児出産雌数／受胎雌数) x 100]。

## 試 験 成 績

### I. 反復投与毒性

#### 1. 雄 (P) に及ぼす影響

##### 1) 一般状態 (Table 1-1~1-2、Appendix 1-1~1-10)

対照群および 200 mg/kg以下の投与群では、異常症状はみられなかった。

1000 mg/kg群では、投与開始 7 日以降に最終投与日まで 1~12 例 (全例) で投与後に流涎がみられた。当症状は投与後 2~3 分からみられたが、投与後約 10 分には消失していた。その他には、異常症状は観察されなかった。

##### 2) 体 重 (Table 2、Fig. 1、Appendix 2-1~2-5)

各投与群とも対照群とほぼ同様の推移を示し、いずれの測定日にも有意差は認められなかった。

##### 3) 摂餌量 (Table 3、Fig. 2、Appendix 3-1~3-5)

1000 mg/kg 群で投与 6 日に有意な高値が認められた以外には、いずれの測定日にも対照群との間に有意差は認められなかった。

##### 4) 血液学的検査 (Table 4、Appendix 4-1~4-10)

各投与群のいずれの測定項目とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

##### 5) 血液化学的検査 (Table 5、Appendix 5-1~5-20)

1000 mg/kg 群では、対照群に比して総ビリルビンが有意な高値を示した。その他の検査項目では各投与群とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

##### 6) 剖検所見 (Table 6、Appendix 6-1~6-5)

対照群および各投与群のいずれの例とも、剖検で著変はみられなかった。

##### 7) 器官重量 (Table 7、Appendix 7-1~7-5)

1000 mg/kg 群では、対照群に比して肝臓絶対重量および相対重量がともに有意な低値を示した。200 mg/kg以下の投与群では、いずれの器官重量とも対照群との間に有意差は認められなかった。



8) 病理組織学的検査 (Table 8、Appendix 8-1~8-2)

肝臓：ごく軽度の壊死巣が対照群および 1000 mg/kg群の各 1 例 (Photo.1) に、ごく軽度～軽度の肉芽腫が対照群および 1000 mg/kg群の 6~8 例に、ごく軽度～軽度の細胞凝集が対照群および1000 mg/kg 群の 3~5 例にみられた。

心臓：ごく軽度～軽度の細胞浸潤が対照群および 1000 mg/kg群の 1~4 例 (Photo.2) にみられた。

腎臓：ごく軽度の尿細管の好塩基性化が対照群および 1000 mg/kg群の 1~2 例 (Photo.3) に、ごく軽度の細胞浸潤が対照群および 1000 mg/kg群の 1~2 例にみられた。

その他の検査部位 (胸腺、脾臓、精巣、精巣上体、副腎および脳) では、いずれも著変はみられなかった。

2. 雌 (P) に及ぼす影響

1) 一般状態 (Table 9-1~9-3、Appendix 9-1~9-5、10-1~10-5、11-1~11-5)

対照群および 200 mg/kg以下の投与群では、異常症状は観察されなかった。

1000 mg/kg 群では、交配前の投与 7 日以降には 0~6 例で、妊娠期間には 3~12 (全例) 例で、哺育期間には全例で投与後に流涎がみられた。当症状は投与後 2~3 分からみられたが、投与後約 10 分には消失していた。その他には、異常症状は観察されなかった。

2) 体 重 (Table 10-1~10-3、Fig.3-1~3-2、Appendix 12-1~12-5、13-1~13-5、14-1~14-5)

交配開始前および交配期間中、妊娠期間中ならびに哺育期間中を通じて、各投与群の体重は対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

3) 摂餌量 (Table 11-1~11-3、Fig.4-1~4-2、Appendix 15-1~15-5、16-1~16-5、17-1~17-5)

交配開始前および交配期間中、妊娠期間中ならびに哺育期間中を通じて、各投与群の摂餌量は対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

4) 剖検所見 (Table 12、Appendix 18-1~18-5)

対照群および各投与群のいずれの例とも、剖検で著変はみられなかった。

5) 器官重量 (Table 13、Appendix 19-1~19-6)

各投与群とも、いずれの器官重量ともに対照群との間に有意差は認められなかった。

6) 病理組織学的検査 (Table 14、Appendix 20-1~20-2)

肝臓：ごく軽度の壊死巣が対照群の 2 例にみられた。

心臓：ごく軽度の細胞浸潤が 1000mg/kg群の 1 例にみられた。

腎臓：尿細管内にごく軽度のCa沈着が 1000mg/kg群の 1 例にみられた。

脾臓：ごく軽度～軽度の髄外造血が対照群および 1000 mg/kg群の 11～12（全例）例にみられた。

その他の検査部位（胸腺、卵巣、副腎および脳）では、いずれも著変はみられなかった。

## II. 生殖発生毒性

### 1. 親動物（P）の生殖発生に及ぼす影響（Table 15、16、Appendix 21-1～21-5、22-1～22-10）

#### 1) 発情回数

馴化期間中の 7 日間および交配前の投与期間（14 日間）の発情回数は、各投与群とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

#### 2) 交尾率、受胎雌数および受胎率

各群の動物とも、同居開始後 8 日までに全例で交尾が確認された。交尾確認までの日数は、対照群が 3.0 日、各投与群が 1.7～2.9 日でほぼ同程度であった。交尾率は、対照群および各投与群とも 100 %であった。

受胎雌数は対照群および各投与群とも 12（全例）例ずつであった。したがって、受胎率は対照群および各投与群とも 100 %であった。

一方、8 mg/kg群の 1 例（No.151）では死産児のみで新生児は得られなかった。したがって、新生児を分娩した母動物数は対照群、40、200 および 1000 mg/kg群では 12 例ずつであったが、8 mg/kg群では 11 例であった。

#### 3) 妊娠期間および分娩状態

各投与群の妊娠期間は 22.17～22.25 日で対照群の 22.17 日とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。また、いずれの動物とも分娩状態に異常はみられなかった。

#### 4) 黄体数、着床痕数および着床率

黄体数は、各投与群が 17.6～18.8 であり、対照群は 17.3 であった。着床痕数は、各投与群が 15.7～16.7 であり、対照群は 15.1 であった。また、着床率は各投与群が 88.6～93.4 %であり、対照群は 86.8 %であった。いずれの項目も、各投与群とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

#### 5) 出産率

対照群、40、200 および 1000 mg/kg群の出産率は 100 %であった。一方、8 mg/kg群の

1 例では新生児が得られなかったため出産率は 91.7 %であったが、対照群との間に有意差は認められなかった。

## 2. 新生児 (F1) に及ぼす影響 (Table 16、Table 17、Table 18、Fig.5、Appendix 22-1~22-10、23-1~23-5)

### 1) 総出産児数および分娩率

総出産児数は、対照群が 14.6 例、各投与群が 14.7~15.6 例であった。また、分娩率は対照群が 94.6 %、各投与群では 93.5~94.8 %であった。総出産児数および分娩率は各投与群とも対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

### 2) 出生率、児の産出率および性比

哺育 0 日の新生児数は、対照群が 13.9、各投与群では 12.9~15.0 であった。総死産児数は対照群が 0.7 例に対して、40、200 および 1000 mg/kg群で 0.4~1.0 例、8 mg/kg群で 1.8 例であった。総出産児数に対する哺育 0 日の新生児数を示す出生率は、対照群が 96.0 %、40、200 および 1000 mg/kg群が 94.3~97.4 %、8 mg/kg群が 88.7 %であった。また、着床痕数に対する哺育 0 日の新生児数を示す児の産出率は、対照群が 90.7 %、40、200 および 1000 mg/kg 群が 89.2~91.2 %、8 mg/kg群が 84.2 %であった。8 mg/kg群では 1 母動物で死産児のみで新生児が得られなかったため、対照群に比してやや低値あるいは高値を示す項目があったが、いずれの指標とも有意差は認められなかった。また、性比は各投与群が 0.46~0.49 であり、対照群の 0.53 とほぼ同程度であった。

### 3) 新生児の一般状態、哺育 4 日の生存率および外表異常の観察

新生児の一般状態では、いずれの群とも異常症状は観察されなかった。

哺育期間中に、対照群および各投与群で 1~6 例の死亡例がみられた。また、哺育 4 日の新生児数は、対照群が 13.4 例、各投与群で 14.0~14.8 例であった。哺育 4 日の生存率は、対照群が 96.7 %、各投与群が 97.7~99.4 %であった。いずれの指標とも対照群との有意差は認められず、明確な用量依存性もみられなかった。

新生児の外表異常の観察では、200 mg/kg群の 1 例で曲尾が、1000 mg/kg 群の 1 例で短尾がみられた。なお、死産児では 8 mg/kg群の 1 例で短尾がみられた。その他には、著変はみられなかった。

### 4) 新生児の体重

各投与群の体重は、哺育 0 日および 4 日とも雌雄ともに対照群とほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。

## 5) 新生児の剖検所見

前述の曲尾および短尾以外には、いずれの例とも剖検で著変はみられなかった。

## 考 察

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の、ラットを用いた反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。投与段階は、1000 mg/kg を最高用量とし、以下 200、40 および 8 mg/kg とした。

雄（P）動物に対しては、一般状態観察で 1000 mg/kg 群では投与期間の初期から少数例～全例で投与後 2～3 分に流涎がみられたが、持続時間は約 10 分間であり、投与の継続により発現例数は増加したものの、持続時間の延長はみられなかった。摂餌量では、1000 mg/kg 群で一過性の高値が認められたが、体重に影響を及ぼす程のものではなく、偶発所見と考えられた。器官重量測定では 1000 mg/kg 群で肝臓の絶対重量および相対重量の有意な低値が認められ、血液化学的検査では総ビリルビンが有意な高値を示したことから、当器官への影響がうかがわれた。しかしながら、総ビリルビンの変動幅はごくわずかであり、さらにほぼ同週齢ラットの当社におけるバックグラウンドデータ<sup>3)</sup>にみられる程度の数値であることから、生理的範囲内の値と考えられた。また、その他の肝臓の機能に関連すると思われる検査値に変動はみられず、病理組織学的検査でも当群に特異的な組織変化はみられなかった。したがって、総ビリルビンの変動は毒性学的な意義の無いものと思われた。剖検では著変はみられず、さらに体重および血液学的検査でも各投与群とも対照群との間に有意差は認められなかった。

雌（P）動物に対しては、一般状態観察では雄の場合と同様で 1000 mg/kg 群では投与期間の初期から少数例～全例で投与後に流涎がみられたが、持続時間は約 10 分であり、一過性の症状であった。体重、摂餌量、剖検および病理組織学的検査では被験物質投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

したがって、当試験条件下における 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の一般毒性学的な無影響量は、1000 mg/kg 群の雌雄で投与後に流涎がみられること、さらに雄では肝臓重量の低値が認められることから、200 mg/kg と推察された。

親動物（P）の生殖発生に対しては、交尾率、受胎率、発情回数および受胎雌数には、各投与群とも影響はみられなかった。また、各投与群とも妊娠期間、分娩状態、黄体数、着床痕数、着床率および出産率に影響はみられなかった。

新生児（F<sub>1</sub>）に対しては、各投与群で総出産児数、分娩率、死産児数、哺育 0 日の新生児数、出生率、児の産出率、性比に用量に依存した変動は認められなかった。また、一般

状態および剖検で異常はみられず、哺育 4 日の新生児数および生存率に用量にも依存した変動は認められなかった。体重にも影響は認められなかった。外表観察では 200 mg/kg 群および 1000 mg/kg 群の各 1 例で曲尾と短尾がみられたが、発現頻度は低く、被験物質投与との関連性の無い自然発生的変化と考えられた。

したがって、当試験条件下では 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄の生殖および児動物の発生に関して、いずれも 1000 mg/kg と推察された。

以上により、当試験条件下における一般毒性学的な無影響量は 200 mg/kg と推察された。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄の生殖および児動物の発生に関していずれも 1000 mg/kg と推察された。

## 資 料

- 1) OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS、Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室から提供された資料)
- 2) 「2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-2) のラットにおける経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験の予備試験」の最終報告書 (株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所、平成 6 年 9 月 30 日)
- 3) Background Data、Crj: CD (SD) Male Rats 18~20 Weeks (株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)

Table 1-1. General sign of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)                       |            | Number of males<br>and general sign | 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 |
| Control                                | 0          | Number of males                     | 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 |
|                                        |            | Normal                              | 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 |
| 2-Amino-1-<br>naphthalenesulfonic Acid | 8          | Number of males                     | 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 |
|                                        |            | Normal                              | 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 |
|                                        | 40         | Number of males                     | 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 |
|                                        |            | Normal                              | 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 |
|                                        | 200        | Number of males                     | 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 |
|                                        |            | Normal                              | 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 |
|                                        | 1000       | Number of males                     | 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 |
|                                        |            | Normal                              | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 7  | 8  | 9  | 7  | 9  | 11 | 3  | 3  | 3   | 3  | 4  | 7  | 5  | 2  | 3  | 5  | 8  | 2  | 0  |
|                                        | Salivation | 0                                   | 0                      | 0  | 0  | 0  | 0  | 5  | 4  | 3  | 5  | 3  | 1  | 9  | 9  | 9  | 9   | 8  | 5  | 7  | 10 | 9  | 7  | 4  | 10 | 12 |    |

\*: Commencement of pairing.

Table 1-2. General sign of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group (mg/kg)                      |      | Number of males and general sign | Days of administration |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
|------------------------------------|------|----------------------------------|------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|--|--|
|                                    |      |                                  | 26                     | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |  |  |  |
| control                            | 0    | Number of males                  | 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 |  |  |  |
|                                    |      | Normal                           | 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 |  |  |  |
| 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid | 8    | Number of males                  | 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 |  |  |  |
|                                    |      | Normal                           | 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 |  |  |  |
|                                    | 40   | Number of males                  | 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 |  |  |  |
|                                    |      | Normal                           | 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 |  |  |  |
|                                    | 200  | Number of males                  | 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 |  |  |  |
|                                    |      | Normal                           | 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 |  |  |  |
|                                    | 1000 | Number of males                  | 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 |  |  |  |
|                                    |      | Normal                           | 0                      | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 12 |  |  |  |
| Salivation                         |      | 12                               | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 11 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 0  |    |  |  |  |

#: The day of necropsy.

Table 2. Body weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)       |  | Control      |  | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |  |              |              |
|------------------------|--|--------------|--|------------------------------------|--|--------------|--------------|
|                        |  | 0            |  | 8                                  |  | 40           |              |
| Number of males        |  | 12           |  | 12                                 |  | 12           |              |
| Days of administration |  | 12           |  | 12                                 |  | 12           |              |
| 1                      |  | 371.9 ± 10.6 |  | 369.2 ± 12.3                       |  | 375.0 ± 8.3  | 373.2 ± 10.0 |
| 4                      |  | 389.6 ± 14.9 |  | 385.5 ± 17.0                       |  | 387.2 ± 14.5 | 388.7 ± 9.2  |
| 8                      |  | 403.5 ± 17.1 |  | 397.7 ± 22.3                       |  | 400.6 ± 17.1 | 406.3 ± 12.5 |
| 11                     |  | 414.5 ± 19.0 |  | 408.1 ± 24.7                       |  | 410.5 ± 17.9 | 417.2 ± 13.7 |
| 15                     |  | 430.1 ± 20.4 |  | 420.7 ± 26.6                       |  | 425.1 ± 20.5 | 430.5 ± 16.6 |
| 18                     |  | 440.7 ± 18.7 |  | 429.7 ± 29.8                       |  | 433.2 ± 21.8 | 438.2 ± 16.8 |
| 22                     |  | 455.2 ± 19.3 |  | 445.2 ± 27.4                       |  | 448.4 ± 24.0 | 454.7 ± 17.7 |
| 25                     |  | 462.7 ± 21.0 |  | 448.7 ± 29.7                       |  | 458.2 ± 21.7 | 461.8 ± 19.2 |
| 29                     |  | 477.7 ± 19.9 |  | 460.2 ± 32.2                       |  | 471.7 ± 22.0 | 473.4 ± 21.6 |
| 32                     |  | 487.2 ± 19.1 |  | 469.1 ± 32.7                       |  | 480.5 ± 19.7 | 482.7 ± 22.3 |
| 36                     |  | 496.7 ± 23.9 |  | 481.2 ± 34.7                       |  | 492.6 ± 23.1 | 492.3 ± 23.0 |
| 39                     |  | 503.7 ± 25.4 |  | 487.7 ± 36.1                       |  | 500.1 ± 25.1 | 498.3 ± 23.3 |
| 43                     |  | 513.2 ± 27.6 |  | 496.4 ± 36.0                       |  | 509.7 ± 25.8 | 503.1 ± 22.8 |
| 46                     |  | 516.7 ± 27.9 |  | 502.4 ± 39.5                       |  | 513.9 ± 26.0 | 507.1 ± 23.2 |
| 50                     |  | 494.7 ± 24.8 |  | 480.2 ± 38.2                       |  | 493.9 ± 26.6 | 485.6 ± 21.4 |

Each value shows mean (g) ± S.D.



Table 3. Food consumption of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)            |        | Control |        | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |        |        |        |        |        |        |       |
|-----------------------------|--------|---------|--------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
|                             |        | 0       |        | 8                                  |        | 40     |        | 200    |        | 1000   |       |
| Number of males             |        | 12      |        | 12                                 |        | 12     |        | 12     |        | 12     |       |
| Days of admin-<br>istration | 3      | 27.1 ±  | 2.5    | 28.0 ±                             | 1.9    | 28.6 ± | 2.7    | 28.4 ± | 2.6    | 28.2 ± | 2.1   |
|                             | 6      | 26.7 ±  | 1.9    | 27.2 ±                             | 2.3    | 27.8 ± | 1.7    | 28.9 ± | 1.9    | 29.6 ± | 2.9** |
|                             | 10     | 26.7 ±  | 2.2    | 25.5 ±                             | 2.9    | 26.8 ± | 2.1    | 27.4 ± | 1.4    | 28.3 ± | 2.5   |
|                             | 13     | 26.2 ±  | 2.2    | 25.7 ±                             | 2.6    | 26.8 ± | 1.5    | 27.3 ± | 1.9    | 28.2 ± | 2.8   |
|                             | 27     | 28.0 ±  | 2.4    | 26.5 ±                             | 2.2    | 29.2 ± | 1.6    | 28.2 ± | 2.0    | 29.2 ± | 2.8   |
|                             | 31     | 28.5 ±  | 1.9    | 27.2 ±                             | 2.0    | 28.7 ± | 1.6    | 27.9 ± | 2.2    | 28.2 ± | 2.6   |
|                             | 34     | 28.9 ±  | 2.4    | 27.2 ±                             | 1.9    | 29.0 ± | 1.6    | 28.3 ± | 1.9    | 29.7 ± | 2.6   |
|                             | 38     | 27.8 ±  | 2.0    | 28.1 ±                             | 2.4    | 29.3 ± | 1.8    | 27.9 ± | 2.3    | 28.6 ± | 3.1   |
| 41                          | 27.6 ± | 2.2     | 27.7 ± | 2.3                                | 28.5 ± | 1.8    | 26.7 ± | 2.5    | 27.0 ± | 2.9    |       |
| 45                          | 27.2 ± | 1.8     | 27.8 ± | 3.0                                | 28.8 ± | 2.0    | 26.9 ± | 1.8    | 28.2 ± | 2.4    |       |
| 48                          | 26.2 ± | 2.4     | 27.7 ± | 2.3                                | 28.8 ± | 2.3    | 27.3 ± | 1.6    | 28.0 ± | 2.8    |       |

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control (\*\*: P<0.01).

Table 4. Hematological finding of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)                | Control  |       | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |      |          |       |          |          |          |       |    |  |
|---------------------------------|----------|-------|------------------------------------|------|----------|-------|----------|----------|----------|-------|----|--|
|                                 | 0        |       | 8                                  |      | 40       |       | 200      |          | 1000     |       |    |  |
| Number of males                 | 12       |       | 12                                 |      | 12       |       | 12       |          | 12       |       | 12 |  |
| RBC ( $10^3/\text{mm}^3$ )      | 911.3 ±  | 34.8  | 886.5 ±                            | 46.3 | 892.3 ±  | 32.5  | 887.0 ±  | 43.7     | 873.2 ±  | 54.6  |    |  |
| Hemoglobin (g/dl)               | 15.99 ±  | 0.53  | 15.59 ±                            | 0.43 | 15.76 ±  | 0.57  | 15.80 ±  | 0.38     | 15.61 ±  | 0.55  |    |  |
| Hematocrit (%)                  | 47.10 ±  | 1.57  | 46.15 ±                            | 1.16 | 46.45 ±  | 1.47  | 46.26 ±  | 0.97     | 45.92 ±  | 1.47  |    |  |
| MCV ( $\mu\text{m}^3$ )         | 51.71 ±  | 1.41  | 52.14 ±                            | 1.86 | 52.07 ±  | 1.53  | 52.23 ±  | 1.91     | 52.70 ±  | 2.17  |    |  |
| MCH (pg)                        | 17.57 ±  | 0.55  | 17.61 ±                            | 0.70 | 17.67 ±  | 0.65  | 17.84 ±  | 0.59     | 17.92 ±  | 0.71  |    |  |
| MCHC (g/dl)                     | 33.95 ±  | 0.43  | 33.80 ±                            | 0.49 | 33.92 ±  | 0.46  | 34.16 ±  | 0.27     | 33.98 ±  | 0.53  |    |  |
| Platelet ( $10^3/\text{mm}^3$ ) | 110.15 ± | 13.54 | 110.36 ±                           | 8.57 | 103.51 ± | 16.40 | 104.82 ± | 10.82    | 103.40 ± | 13.24 |    |  |
| RET (%)                         | 25.1 ±   | 5.5   | 24.8 ±                             | 3.1  | 25.4 ±   | 4.9   | 24.0 ±   | 5.0      | 23.4 ±   | 4.3   |    |  |
| PT (SEC.)                       | 15.17 ±  | 2.66  | 14.44 ±                            | 1.32 | 14.20 ±  | 1.86  | 15.92 ±  | 1.81(11) | 14.47 ±  | 1.75  |    |  |
| APTT (SEC.)                     | 29.52 ±  | 2.97  | 28.26 ±                            | 2.93 | 28.59 ±  | 2.78  | 29.65 ±  | 2.08(11) | 28.74 ±  | 2.27  |    |  |
| Fibrinogen (mg/dl)              | 240.0 ±  | 20.1  | 247.2 ±                            | 16.4 | 237.0 ±  | 20.6  | 239.1 ±  | 5.4(11)  | 239.2 ±  | 11.1  |    |  |
| WBC ( $10^2/\text{mm}^3$ )      | 65.8 ±   | 16.0  | 64.2 ±                             | 17.9 | 68.2 ±   | 22.4  | 66.0 ±   | 20.4     | 67.5 ±   | 19.0  |    |  |
| Differential leukocyte (%)      |          |       |                                    |      |          |       |          |          |          |       |    |  |
| Lymphocyte                      | 91.5 ±   | 4.4   | 90.7 ±                             | 3.3  | 90.8 ±   | 3.0   | 92.0 ±   | 4.3      | 91.2 ±   | 4.2   |    |  |
| Neutrophil                      | 7.6 ±    | 4.4   | 8.9 ±                              | 3.3  | 8.4 ±    | 2.8   | 7.6 ±    | 4.1      | 8.1 ±    | 3.8   |    |  |
| Eosinophil                      | 0.5 ±    | 0.5   | 0.1 ±                              | 0.3  | 0.4 ±    | 0.5   | 0.1 ±    | 0.3      | 0.4 ±    | 0.7   |    |  |
| Basophil                        | 0.0 ±    | 0.0   | 0.0 ±                              | 0.0  | 0.0 ±    | 0.0   | 0.0 ±    | 0.0      | 0.0 ±    | 0.0   |    |  |
| Monocyte                        | 0.4 ±    | 0.7   | 0.3 ±                              | 0.7  | 0.3 ±    | 0.5   | 0.3 ±    | 0.5      | 0.3 ±    | 0.5   |    |  |

Each value shows mean ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of males.

Table 5. Blood chemical analysis of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)   | Control  |       | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |       |          |       |          |       |          |         |  |  |
|--------------------|----------|-------|------------------------------------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|---------|--|--|
|                    | 0        |       | 8                                  |       | 40       |       | 200      |       | 1000     |         |  |  |
| Number of males    | 12       |       | 12                                 |       | 12       |       | 12       |       | 12       |         |  |  |
| GOT (IU/l)         | 64.14 ±  | 8.24  | 73.41 ±                            | 16.26 | 64.26 ±  | 4.41  | 68.51 ±  | 14.25 | 71.06 ±  | 13.28   |  |  |
| GPT (IU/l)         | 20.95 ±  | 2.83  | 22.61 ±                            | 6.48  | 21.91 ±  | 3.36  | 22.03 ±  | 5.07  | 28.47 ±  | 11.30   |  |  |
| γ-GTP (IU/l)       | 0.00 ±   | 0.00  | 0.00 ±                             | 0.00  | 0.00 ±   | 0.00  | 0.00 ±   | 0.00  | 0.00 ±   | 0.00    |  |  |
| TP (g/dl)          | 5.74 ±   | 0.18  | 5.72 ±                             | 0.17  | 5.70 ±   | 0.22  | 5.61 ±   | 0.27  | 5.53 ±   | 0.25    |  |  |
| Albumin (g/dl)     | 2.852 ±  | 0.123 | 2.903 ±                            | 0.121 | 2.900 ±  | 0.100 | 2.871 ±  | 0.138 | 2.886 ±  | 0.157   |  |  |
| T-BIL (mg/dl)      | 0.065 ±  | 0.015 | 0.071 ±                            | 0.008 | 0.074 ±  | 0.012 | 0.068 ±  | 0.014 | 0.096 ±  | 0.013** |  |  |
| BUN (mg/dl)        | 19.72 ±  | 2.34  | 19.72 ±                            | 2.18  | 18.98 ±  | 1.83  | 19.02 ±  | 2.20  | 17.87 ±  | 2.73    |  |  |
| Creatinine (mg/dl) | 0.500 ±  | 0.073 | 0.474 ±                            | 0.039 | 0.458 ±  | 0.044 | 0.451 ±  | 0.047 | 0.449 ±  | 0.035   |  |  |
| Glucose (mg/dl)    | 124.62 ± | 13.72 | 123.78 ±                           | 13.68 | 130.25 ± | 18.15 | 121.46 ± | 11.18 | 119.02 ± | 8.68    |  |  |
| Na (mEq/l)         | 145.80 ± | 1.24  | 145.77 ±                           | 1.31  | 145.71 ± | 1.74  | 145.85 ± | 1.26  | 145.53 ± | 1.32    |  |  |
| K (mEq/l)          | 4.233 ±  | 0.272 | 4.312 ±                            | 0.215 | 4.209 ±  | 0.211 | 4.245 ±  | 0.168 | 4.205 ±  | 0.195   |  |  |
| CL (mEq/l)         | 105.24 ± | 1.08  | 105.55 ±                           | 0.82  | 105.52 ± | 1.28  | 105.75 ± | 1.07  | 105.08 ± | 1.01    |  |  |
| Ca (mg/dl)         | 9.98 ±   | 0.23  | 10.03 ±                            | 0.22  | 10.18 ±  | 0.28  | 9.97 ±   | 0.34  | 10.17 ±  | 0.25    |  |  |
| IP (mg/dl)         | 6.27 ±   | 0.74  | 6.34 ±                             | 0.42  | 6.22 ±   | 0.73  | 6.29 ±   | 0.74  | 6.87 ±   | 0.61    |  |  |

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (\*\*: P<0.01).

Table 6. Necropsy finding of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive / developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group           | Control | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |    |     |      |
|-----------------|---------|------------------------------------|----|-----|------|
| (mg/kg)         | 0       | 8                                  | 40 | 200 | 1000 |
| Number of males | 12      | 12                                 | 12 | 12  | 12   |
| Normal          | 12      | 12                                 | 12 | 12  | 12   |

Table 7. Organ weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg) | Control        |  | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |  |                 |  |                |  |                 |  |  |  |
|------------------|----------------|--|------------------------------------|--|-----------------|--|----------------|--|-----------------|--|--|--|
|                  | 0              |  | 8                                  |  | 40              |  | 200            |  | 1000            |  |  |  |
| Number of males  | 12             |  | 12                                 |  | 12              |  | 12             |  | 12              |  |  |  |
| Body weight (g)  | 494.7 ± 24.8   |  | 480.2 ± 38.2                       |  | 493.9 ± 26.6    |  | 485.6 ± 21.4   |  | 478.2 ± 26.4    |  |  |  |
| Thymus           | (mg)           |  | (mg)                               |  | (mg)            |  | (mg)           |  | (mg)            |  |  |  |
|                  | 356.11 ± 82.33 |  | 328.28 ± 72.93                     |  | 349.02 ± 101.54 |  | 290.50 ± 45.01 |  | 305.75 ± 91.68  |  |  |  |
| Liver            | (mg%)          |  | (mg%)                              |  | (mg%)           |  | (mg%)          |  | (mg%)           |  |  |  |
|                  | 72.63 ± 19.59  |  | 68.02 ± 11.52                      |  | 70.59 ± 20.10   |  | 59.93 ± 9.55   |  | 64.47 ± 21.25   |  |  |  |
| Kidneys          | (g)            |  | (g)                                |  | (g)             |  | (g)            |  | (g)             |  |  |  |
|                  | 13.097 ± 1.668 |  | 12.369 ± 1.334                     |  | 13.451 ± 1.885  |  | 12.503 ± 1.067 |  | 11.477 ± 1.082* |  |  |  |
| Testes           | (g%)           |  | (g%)                               |  | (g%)            |  | (g%)           |  | (g%)            |  |  |  |
|                  | 2.641 ± 0.244  |  | 2.576 ± 0.183                      |  | 2.716 ± 0.285   |  | 2.573 ± 0.139  |  | 2.398 ± 0.141*  |  |  |  |
| Epididymides     | (g)            |  | (g)                                |  | (g)             |  | (g)            |  | (g)             |  |  |  |
|                  | 2.953 ± 0.231  |  | 3.017 ± 0.222                      |  | 2.977 ± 0.254   |  | 3.029 ± 0.258  |  | 3.032 ± 0.169   |  |  |  |
|                  | (g%)           |  | (g%)                               |  | (g%)            |  | (g%)           |  | (g%)            |  |  |  |
|                  | 0.598 ± 0.047  |  | 0.628 ± 0.039                      |  | 0.603 ± 0.034   |  | 0.624 ± 0.055  |  | 0.635 ± 0.043   |  |  |  |
|                  | (g)            |  | (g)                                |  | (g)             |  | (g)            |  | (g)             |  |  |  |
|                  | 3.339 ± 0.164  |  | 3.399 ± 0.230                      |  | 3.527 ± 0.263   |  | 3.322 ± 0.245  |  | 3.379 ± 0.141   |  |  |  |
|                  | (g%)           |  | (g%)                               |  | (g%)            |  | (g%)           |  | (g%)            |  |  |  |
|                  | 0.675 ± 0.038  |  | 0.710 ± 0.053                      |  | 0.715 ± 0.057   |  | 0.685 ± 0.056  |  | 0.708 ± 0.037   |  |  |  |
|                  | (g)            |  | (g)                                |  | (g)             |  | (g)            |  | (g)             |  |  |  |
|                  | 1.271 ± 0.079  |  | 1.325 ± 0.122                      |  | 1.305 ± 0.114   |  | 1.322 ± 0.083  |  | 1.279 ± 0.070   |  |  |  |
|                  | (g%)           |  | (g%)                               |  | (g%)            |  | (g%)           |  | (g%)            |  |  |  |
|                  | 0.257 ± 0.012  |  | 0.278 ± 0.014                      |  | 0.265 ± 0.026   |  | 0.272 ± 0.021  |  | 0.268 ± 0.017   |  |  |  |

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (\*: P<0.05).

Table 8. Histopathological finding of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group                                |       | Control |   | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |    |     |    |   |   |    |     |    |   |   |    |     |     |   |   |    |     |      |   |   |    |     |  |  |
|--------------------------------------|-------|---------|---|------------------------------------|----|-----|----|---|---|----|-----|----|---|---|----|-----|-----|---|---|----|-----|------|---|---|----|-----|--|--|
| (mg/kg)                              |       | 0       |   |                                    |    |     | 8  |   |   |    |     | 40 |   |   |    |     | 200 |   |   |    |     | 1000 |   |   |    |     |  |  |
| Finding                              | Grade | —       | ± | +                                  | ++ | +++ | —  | ± | + | ++ | +++ | —  | ± | + | ++ | +++ | —   | ± | + | ++ | +++ | —    | ± | + | ++ | +++ |  |  |
| Liver                                |       |         |   |                                    |    |     |    |   |   |    |     |    |   |   |    |     |     |   |   |    |     |      |   |   |    |     |  |  |
| Focal necrosis                       |       | 11      | 1 | 0                                  | 0  | 0   |    |   |   |    |     |    |   |   |    |     |     |   |   |    |     | 11   | 1 | 0 | 0  | 0   |  |  |
| Granuloma                            |       | 4       | 6 | 2                                  | 0  | 0   |    |   |   |    |     |    |   |   |    |     |     |   |   |    |     | 6    | 6 | 0 | 0  | 0   |  |  |
| Cell aggregation                     |       | 9       | 3 | 0                                  | 0  | 0   |    |   |   |    |     |    |   |   |    |     |     |   |   |    |     | 7    | 4 | 1 | 0  | 0   |  |  |
| Heart                                |       |         |   |                                    |    |     | NE |   |   |    |     | NE |   |   |    |     | NE  |   |   |    |     |      |   |   |    |     |  |  |
| Cell infiltration                    |       | 8       | 3 | 1                                  | 0  | 0   |    |   |   |    |     |    |   |   |    |     |     |   |   |    |     | 11   | 1 | 0 | 0  | 0   |  |  |
| Kidney                               |       |         |   |                                    |    |     |    |   |   |    |     |    |   |   |    |     |     |   |   |    |     |      |   |   |    |     |  |  |
| Basophilic change of urinary tubules |       | 11      | 1 | 0                                  | 0  | 0   |    |   |   |    |     |    |   |   |    |     |     |   |   |    |     | 10   | 2 | 0 | 0  | 0   |  |  |
| Cell infiltration                    |       | 10      | 2 | 0                                  | 0  | 0   |    |   |   |    |     |    |   |   |    |     |     |   |   |    |     | 11   | 1 | 0 | 0  | 0   |  |  |

Grade: —: No abnormal detect (NAD), ±: Slight, +: Mild, ++: Moderate, +++: Marked.

No remarkable changes were recognized in following organs.: Thymus, Spleen, Testis, Epididymis, Adrenal gland and Brain.

NE: Not examined.

Table 9-1. General sign of female rats (P) during pre-mating and mating periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)                   |      | Number of females<br>and general sign | 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 |  |  |
| Control                            | 0    | Number of females                     | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12  | 10 | 9  | 5  | -  | -  | -  | -  |  |  |
|                                    |      | Normal                                | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12  | 10 | 9  | 5  | -  | -  | -  | -  |  |  |
| 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid | 8    | Number of females                     | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12  | 8  | 7  | 3  | -  | -  | -  | -  |  |  |
|                                    |      | Normal                                | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12  | 8  | 7  | 3  | -  | -  | -  | -  |  |  |
|                                    | 40   | Number of females                     | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12  | 9  | 6  | 3  | 1  | 1  | 1  | 1  |  |  |
|                                    |      | Normal                                | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12  | 9  | 6  | 3  | 1  | 1  | 1  | 1  |  |  |
|                                    | 200  | Number of females                     | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12  | 7  | 2  | 1  | -  | -  | -  | -  |  |  |
|                                    |      | Normal                                | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12  | 7  | 2  | 1  | -  | -  | -  | -  |  |  |
|                                    | 1000 | Number of females                     | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12  | 10 | 7  | 6  | -  | -  | -  | -  |  |  |
|                                    |      | Normal                                | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 9  | 9  | 9  | 10 | 10 | 12 | 6  | 9  | 7   | 5  | 4  | 5  | -  | -  | -  | -  |  |  |
|                                    |      | Salivation                            | 0                      | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 3  | 3  | 3  | 2  | 2  | 0  | 6  | 3  | 5   | 5  | 3  | 1  | -  | -  | -  | -  |  |  |

\*: Commencement of pairing.

Table 9-2. General sign of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)                       |      | Number of dams<br>and general sign | Days of administration |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----------------------------------------|------|------------------------------------|------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                        |      |                                    | 0                      | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
| Control                                | 0    | 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 | 3  |
|                                        |      | Normal                             | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 3  |
| 2-Amino-1-<br>naphthalenesulfonic Acid | 8    | 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 | 3  |
|                                        |      | Normal                             | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 3  |
|                                        | 40   | 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 | 3  |
|                                        |      | Normal                             | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 3  |
|                                        | 200  | 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 | 2  |
|                                        |      | Normal                             | 12                     | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 2  |
|                                        | 1000 | 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 | 2  |
|                                        |      | Normal                             | 6                      | 7  | 6  | 4  | 8  | 5  | 9  | 5  | 5  | 3  | 2  | 4  | 1  | 1  | 3  | 4  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Salivation                             |      | 6                                  | 5                      | 6  | 8  | 4  | 7  | 3  | 7  | 7  | 9  | 10 | 8  | 11 | 11 | 9  | 8  | 11 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 2  |    |



Table 9-3. General sign of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)                   |      | Number of dams<br>and general sign | Days of lactation |    |    |    |    |
|------------------------------------|------|------------------------------------|-------------------|----|----|----|----|
|                                    |      |                                    | 0                 | 1  | 2  | 3  | 4# |
| Control                            | 0    | Number of dams                     | 12                | 12 | 12 | 12 | 12 |
|                                    |      | Normal                             | 12                | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid | 8    | Number of dams                     | 11                | 11 | 11 | 11 | 11 |
|                                    |      | Normal                             | 11                | 11 | 11 | 11 | 11 |
|                                    | 40   | Number of dams                     | 12                | 12 | 12 | 12 | 12 |
|                                    |      | Normal                             | 12                | 12 | 12 | 12 | 12 |
|                                    | 200  | Number of dams                     | 12                | 12 | 12 | 12 | 12 |
|                                    |      | Normal                             | 12                | 12 | 12 | 12 | 12 |
|                                    | 1000 | Number of dams                     | 12                | 12 | 12 | 12 | 12 |
|                                    |      | Normal                             | 0                 | 0  | 0  | 0  | 12 |
|                                    |      | Salivation                         | 12                | 12 | 12 | 12 | 0  |

#: The day of necropsy.

Table 10-1. Body weight of female rats (P) during pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)            |    | Control      | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |             |              |              |
|-----------------------------|----|--------------|------------------------------------|-------------|--------------|--------------|
|                             |    | 0            | 8                                  | 40          | 200          | 1000         |
| Number of females           |    | 12           | 12                                 | 12          | 12           | 12           |
| Days of admin-<br>istration | 1  | 224.6 ± 7.5  | 224.6 ± 7.6                        | 222.5 ± 5.7 | 225.9 ± 5.0  | 226.2 ± 5.3  |
|                             | 4  | 223.6 ± 6.7  | 224.4 ± 8.2                        | 225.3 ± 6.3 | 229.0 ± 7.1  | 228.3 ± 7.8  |
|                             | 8  | 232.5 ± 9.7  | 232.2 ± 6.5                        | 235.2 ± 8.1 | 236.7 ± 9.3  | 233.5 ± 7.7  |
|                             | 11 | 233.6 ± 13.0 | 236.4 ± 6.8                        | 239.3 ± 8.6 | 244.1 ± 10.5 | 236.4 ± 11.6 |
|                             | 15 | 239.8 ± 13.3 | 243.2 ± 7.8                        | 247.1 ± 9.1 | 252.5 ± 11.6 | 242.1 ± 11.8 |

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 10-2. Body weight of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)  | Control      |              | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |              |              |      |
|-------------------|--------------|--------------|------------------------------------|--------------|--------------|------|
|                   | 0            |              | 8                                  | 40           | 200          | 1000 |
| Number of dams    | 12           |              | 12                                 | 12           | 12           | 12   |
| Days of pregnancy |              |              |                                    |              |              |      |
| 0                 | 250.9 ± 12.6 | 254.2 ± 7.5  | 255.7 ± 9.2                        | 258.3 ± 9.1  | 253.7 ± 11.9 |      |
| 7                 | 283.2 ± 9.3  | 286.8 ± 14.4 | 289.1 ± 11.3                       | 292.2 ± 11.9 | 286.2 ± 12.5 |      |
| 14                | 316.7 ± 10.3 | 320.0 ± 21.4 | 323.0 ± 17.1                       | 325.1 ± 13.2 | 316.8 ± 18.6 |      |
| 21                | 403.5 ± 23.0 | 408.8 ± 28.7 | 415.4 ± 26.1                       | 420.4 ± 18.7 | 411.4 ± 20.0 |      |

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 10-3. Body weight of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)  |   | Control      | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |              |              |              |
|-------------------|---|--------------|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                   |   | 0            | 8                                  | 40           | 200          | 1000         |
| Number of dams    |   | 12           | 11                                 | 12           | 12           | 12           |
| Days of lactation |   |              |                                    |              |              |              |
|                   | 0 | 287.5 ± 16.3 | 297.4 ± 34.6                       | 297.0 ± 22.0 | 302.3 ± 22.2 | 291.9 ± 20.0 |
|                   | 4 | 310.6 ± 13.4 | 309.9 ± 20.0                       | 317.9 ± 20.9 | 316.6 ± 18.2 | 315.1 ± 16.8 |

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 11-1. Food consumption of female rats (P) during pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)            |    | Control    |  | Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |  |            |  |            |  |            |  |
|-----------------------------|----|------------|--|----------------------------------|--|------------|--|------------|--|------------|--|
|                             |    | 0          |  | 8                                |  | 40         |  | 200        |  | 1000       |  |
| Number of females           |    | 12         |  | 12                               |  | 12         |  | 12         |  | 12         |  |
| Days of admin-<br>istration | 3  | 17.2 ± 1.8 |  | 18.3 ± 1.9                       |  | 18.1 ± 2.2 |  | 19.6 ± 2.6 |  | 18.0 ± 2.3 |  |
|                             | 6  | 18.7 ± 1.8 |  | 19.4 ± 2.2                       |  | 18.6 ± 1.4 |  | 19.6 ± 1.6 |  | 19.2 ± 1.7 |  |
|                             | 10 | 18.9 ± 2.3 |  | 19.1 ± 2.8                       |  | 18.1 ± 1.5 |  | 19.2 ± 2.2 |  | 20.2 ± 1.9 |  |
|                             | 13 | 19.2 ± 2.0 |  | 18.8 ± 2.4                       |  | 19.2 ± 2.3 |  | 18.5 ± 2.1 |  | 20.3 ± 2.3 |  |

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 11-2. Food consumption of dams (P) during pregnancy period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)  | Control |     | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |     |        |     |        |     |        |     |
|-------------------|---------|-----|------------------------------------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|
|                   | 0       |     | 8                                  |     | 40     |     | 200    |     | 1000   |     |
| Number of dams    | 12      |     | 12                                 |     | 12     |     | 12     |     | 12     |     |
| Days of pregnancy |         |     |                                    |     |        |     |        |     |        |     |
| 2                 | 22.6 ±  | 2.1 | 23.4 ±                             | 2.8 | 23.2 ± | 1.3 | 22.8 ± | 1.7 | 23.5 ± | 1.4 |
| 9                 | 24.7 ±  | 3.1 | 25.6 ±                             | 3.3 | 26.1 ± | 2.3 | 25.9 ± | 3.4 | 26.7 ± | 1.6 |
| 16                | 24.2 ±  | 3.5 | 24.4 ±                             | 2.9 | 25.0 ± | 4.0 | 24.9 ± | 2.4 | 24.5 ± | 2.5 |
| 21                | 22.8 ±  | 2.2 | 21.7 ±                             | 3.0 | 23.1 ± | 3.5 | 23.5 ± | 2.3 | 23.7 ± | 2.2 |

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 11-3. Food consumption of dams (P) during lactation period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)       | Control    | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |            |            |            |
|------------------------|------------|------------------------------------|------------|------------|------------|
|                        | 0          | 8                                  | 40         | 200        | 1000       |
| Number of dams         | 12         | 11                                 | 12         | 12         | 12         |
| Days of<br>lactation 4 | 31.2 ± 6.3 | 27.5 ± 5.6                         | 32.4 ± 4.2 | 30.6 ± 5.4 | 36.3 ± 7.3 |

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 12. Necropsy finding of dams (P) on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg) | Control | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |    |     |      |
|------------------|---------|------------------------------------|----|-----|------|
|                  | 0       | 8                                  | 40 | 200 | 1000 |
| Number of dams   | 12      | 12                                 | 12 | 12  | 12   |
| Normal           | 12      | 12                                 | 12 | 12  | 12   |



Table 13. Organ weight of dams (P) on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg) | Control        |  | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |  |                |  |                |  |                |  |  |  |
|------------------|----------------|--|------------------------------------|--|----------------|--|----------------|--|----------------|--|--|--|
|                  | 0              |  | 8                                  |  | 40             |  | 200            |  | 1000           |  |  |  |
| Number of dams   | 12             |  | 11                                 |  | 12             |  | 12             |  | 12             |  |  |  |
| Body weight (g)  | 310.6 ± 13.4   |  | 309.9 ± 20.0                       |  | 317.9 ± 20.9   |  | 316.6 ± 18.2   |  | 315.1 ± 16.8   |  |  |  |
| Thymus (mg)      | 221.62 ± 70.45 |  | 201.30 ± 70.54                     |  | 225.48 ± 72.02 |  | 233.65 ± 68.54 |  | 189.17 ± 54.61 |  |  |  |
| (mg%)            | 71.26 ± 22.21  |  | 65.35 ± 23.64                      |  | 70.76 ± 21.91  |  | 73.61 ± 20.13  |  | 60.04 ± 17.20  |  |  |  |
| Liver (g)        | 13.236 ± 1.409 |  | 12.549 ± 1.539                     |  | 13.101 ± 1.908 |  | 12.291 ± 1.065 |  | 13.042 ± 1.429 |  |  |  |
| (g%)             | 4.259 ± 0.377  |  | 4.051 ± 0.442                      |  | 4.105 ± 0.380  |  | 3.881 ± 0.259  |  | 4.145 ± 0.476  |  |  |  |
| Kidneys (g)      | 2.225 ± 0.219  |  | 2.000 ± 0.388                      |  | 2.103 ± 0.326  |  | 2.274 ± 0.331  |  | 2.202 ± 0.244  |  |  |  |
| (g%)             | 0.716 ± 0.063  |  | 0.644 ± 0.107                      |  | 0.668 ± 0.127  |  | 0.720 ± 0.102  |  | 0.700 ± 0.076  |  |  |  |
| Ovaries (mg)     | 104.47 ± 14.06 |  | 99.80 ± 14.25                      |  | 98.69 ± 15.03  |  | 108.09 ± 16.09 |  | 102.92 ± 17.18 |  |  |  |
| (mg%)            | 33.61 ± 4.00   |  | 32.27 ± 4.52                       |  | 31.24 ± 5.76   |  | 34.26 ± 5.57   |  | 32.62 ± 4.96   |  |  |  |

Each value shows mean ± S.D.

Table 14. Histopathological finding of dams (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)                      | Grade | Control |   |   |    |     | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |   |    |    |     |   |      |   |    |     |
|---------------------------------------|-------|---------|---|---|----|-----|------------------------------------|---|----|----|-----|---|------|---|----|-----|
|                                       |       | 0       |   |   |    |     | 8                                  |   | 40 |    | 200 |   | 1000 |   |    |     |
| Finding                               | Grade | —       | ± | + | ++ | +++ | —                                  | ± | +  | ++ | +++ | — | ±    | + | ++ | +++ |
| Liver                                 |       |         |   |   |    |     |                                    |   |    |    |     |   |      |   |    |     |
| Focal necrosis                        |       | 10      | 2 | 0 | 0  | 0   |                                    |   |    |    |     |   | 12   | 0 | 0  | 0   |
| Heart                                 |       |         |   |   |    |     |                                    |   |    |    |     |   |      |   |    |     |
| Cell infiltration                     |       | 12      | 0 | 0 | 0  | 0   |                                    |   |    |    |     |   | 11   | 1 | 0  | 0   |
| Kidney                                |       |         |   |   |    |     | NE                                 |   | NE |    | NE  |   |      |   |    |     |
| Calcium deposition of urinary tubules |       | 12      | 0 | 0 | 0  | 0   |                                    |   |    |    |     |   | 11   | 1 | 0  | 0   |
| Spleen                                |       |         |   |   |    |     |                                    |   |    |    |     |   |      |   |    |     |
| Extramedullary hematopoiesis          |       | 1       | 9 | 2 | 0  | 0   |                                    |   |    |    |     |   | 0    | 7 | 5  | 0   |

Grade: —: No abnormal detect (NAD), ±: Slight, +: Mild, ++: Moderate, +++: Marked.

No remarkable changes were recognized in following organs.: Thymus, Ovary, Adrenal gland and Brain.

NE: Not examined.

Table 15. Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in combined repeat dose and reproductive / developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)                                                          | Control       | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |               |               |               |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
|                                                                           | 0             | 8                                  | 40            | 200           | 1000          |
| Number of females                                                         | 12            | 12                                 | 12            | 12            | 12            |
| Number of estrous cases before administration (7 days)<br>Mean $\pm$ S.D. | 1.8 $\pm$ 0.4 | 1.9 $\pm$ 0.3                      | 1.8 $\pm$ 0.5 | 1.9 $\pm$ 0.3 | 1.8 $\pm$ 0.4 |
| Number of estrous cases before mating (14 days)<br>Mean $\pm$ S.D.        | 3.3 $\pm$ 0.5 | 3.2 $\pm$ 0.4                      | 3.4 $\pm$ 0.5 | 3.3 $\pm$ 0.5 | 3.3 $\pm$ 0.5 |
| Number of pairs                                                           | 12            | 12                                 | 12            | 12            | 12            |
| Number of pairs with successful mating<br>Copulation index (%) a)         | 12<br>100.0   | 12<br>100.0                        | 12<br>100.0   | 12<br>100.0   | 12<br>100.0   |
| Number of days till copulation<br>Mean $\pm$ S.D.                         | 3.0 $\pm$ 1.1 | 2.5 $\pm$ 1.2                      | 2.8 $\pm$ 1.9 | 1.7 $\pm$ 1.0 | 2.9 $\pm$ 1.2 |
| Number of pregnant females<br>Fertility index (%) b)                      | 12<br>100.0   | 12<br>100.0                        | 12<br>100.0   | 12<br>100.0   | 12<br>100.0   |
| Number of pregnant females with live pups                                 | 12            | 11                                 | 12            | 12            | 12            |

a): (Number of pairs with successful copulation / number of pairs)  $\times$  100.

b): (Number of pregnancies / number of pairs with successful copulation)  $\times$  100.

Table 16. Observation of pups (F1) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)                          | Control          | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |                  |                  |                  |
|-------------------------------------------|------------------|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                           | 0                | 8                                  | 40               | 200              | 1000             |
| Number of dams                            | 12               | 12                                 | 12               | 12               | 12               |
| Length of gestation (days)                |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Mean $\pm$ S.D. per dam                   | 22.17 $\pm$ 0.39 | 22.25 $\pm$ 0.45                   | 22.25 $\pm$ 0.45 | 22.17 $\pm$ 0.39 | 22.17 $\pm$ 0.39 |
| Number of corpora lutea                   |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Total                                     | 207              | 212                                | 211              | 213              | 225              |
| Mean $\pm$ S.D. per dam                   | 17.3 $\pm$ 2.1   | 17.7 $\pm$ 2.3                     | 17.6 $\pm$ 2.1   | 17.8 $\pm$ 2.1   | 18.8 $\pm$ 2.2   |
| Number of implantation scars              |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Total                                     | 181              | 188                                | 196              | 191              | 200              |
| Mean $\pm$ S.D. per dam                   | 15.1 $\pm$ 3.5   | 15.7 $\pm$ 3.5                     | 16.3 $\pm$ 1.6   | 15.9 $\pm$ 2.6   | 16.7 $\pm$ 2.4   |
| Implantation index a)                     |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Mean% $\pm$ S.D. per dam                  | 86.8 $\pm$ 16.6  | 88.6 $\pm$ 16.9                    | 93.4 $\pm$ 8.2   | 89.3 $\pm$ 9.2   | 88.8 $\pm$ 7.7   |
| Gestation index (%) b)                    | 100.0            | 91.7                               | 100.0            | 100.0            | 100.0            |
| Number of live pups born                  |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Male                                      | 91               | 74                                 | 85               | 87               | 83               |
| Female                                    | 76               | 81                                 | 89               | 87               | 97               |
| Total                                     | 167              | 155                                | 174              | 174              | 180              |
| Mean $\pm$ S.D. per dam                   | 13.9 $\pm$ 3.6   | 12.9 $\pm$ 5.1                     | 14.5 $\pm$ 2.1   | 14.5 $\pm$ 2.5   | 15.0 $\pm$ 2.1   |
| Sex ratio                                 |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Mean $\pm$ S.D. per dam c)                | 0.53 $\pm$ 0.16  | 0.49 $\pm$ 0.08 (11)               | 0.49 $\pm$ 0.15  | 0.49 $\pm$ 0.08  | 0.46 $\pm$ 0.17  |
| Birth index                               |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Mean% $\pm$ S.D. per dam d)               | 90.7 $\pm$ 12.0  | 84.2 $\pm$ 27.5                    | 89.2 $\pm$ 11.4  | 91.2 $\pm$ 8.0   | 90.4 $\pm$ 7.9   |
| Number of dead pups on day 0 of lactation |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Total                                     | 8                | 21                                 | 12               | 5                | 7                |
| Mean $\pm$ S.D. per dam                   | 0.7 $\pm$ 1.1    | 1.8 $\pm$ 4.3                      | 1.0 $\pm$ 2.3    | 0.4 $\pm$ 0.7    | 0.6 $\pm$ 0.9    |
| Number of pups born                       |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Total                                     | 175              | 176                                | 186              | 179              | 187              |
| Mean $\pm$ S.D. per dam                   | 14.6 $\pm$ 3.9   | 14.7 $\pm$ 3.3                     | 15.5 $\pm$ 1.9   | 14.9 $\pm$ 2.7   | 15.6 $\pm$ 2.2   |
| Delivery index e)                         |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Mean% $\pm$ S.D. per dam                  | 94.6 $\pm$ 11.3  | 93.5 $\pm$ 7.9                     | 94.8 $\pm$ 5.1   | 93.7 $\pm$ 7.3   | 93.6 $\pm$ 6.2   |
| Live birth index f)                       |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Mean% $\pm$ S.D. per dam                  | 96.0 $\pm$ 6.4   | 88.7 $\pm$ 28.4                    | 94.3 $\pm$ 12.7  | 97.4 $\pm$ 4.0   | 96.4 $\pm$ 5.1   |
| Number of live pups on day 4 of lactation |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Male                                      | 88               | 74 (11)                            | 85               | 86               | 81               |
| Female                                    | 73               | 80 (11)                            | 88               | 84               | 97               |
| Total                                     | 161              | 154 (11)                           | 173              | 170              | 178              |
| Mean $\pm$ S.D. per dam                   | 13.4 $\pm$ 3.4   | 14.0 $\pm$ 3.2 (11)                | 14.4 $\pm$ 2.1   | 14.2 $\pm$ 2.5   | 14.8 $\pm$ 2.1   |
| Viability index g)                        |                  |                                    |                  |                  |                  |
| Mean% $\pm$ S.D. per dam                  | 96.7 $\pm$ 6.0   | 99.4 $\pm$ 2.1 (11)                | 99.4 $\pm$ 2.0   | 97.7 $\pm$ 3.5   | 98.8 $\pm$ 2.8   |
| Number of external anomalies              | 0                | 0 (11)                             | 0                | 1                | 1                |
| Mean% $\pm$ S.D. per dam                  | 0.0 $\pm$ 0.0    | 0.0 $\pm$ 0.0                      | 0.0 $\pm$ 0.0    | 0.5 $\pm$ 1.7    | 0.5 $\pm$ 1.7    |
| Kinky tail                                | 0                | 0 (11)                             | 0                | 1                | 0                |
| Mean% $\pm$ S.D. per dam                  | 0.0 $\pm$ 0.0    | 0.0 $\pm$ 0.0                      | 0.0 $\pm$ 0.0    | 0.5 $\pm$ 1.7    | 0.0 $\pm$ 0.0    |
| Brachyury                                 | 0                | 0 (11)                             | 0                | 0                | 1                |
| Mean% $\pm$ S.D. per dam                  | 0.0 $\pm$ 0.0    | 0.0 $\pm$ 0.0                      | 0.0 $\pm$ 0.0    | 0.0 $\pm$ 0.0    | 0.5 $\pm$ 1.7    |

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

c): Number of male pups / number of live pups.

e): (Number of pups born / number of implantation scars) X 100.

g): (Number of live pups on day 4 / number of live pups born) X 100.

Figures in parentheses indicate number of dams.

b): (Number of females with live pups / number of pregnant dams) X 100.

d): (Number of live pups born / number of implantation scars) X 100.

f): (Number of live pups born / number of pups born) X 100.

Table 17. Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg)    | Control      | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |              |              |              |  |
|---------------------|--------------|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--|
|                     | 0            | 8                                  | 40           | 200          | 1000         |  |
| Number of dams      | 12           | 11                                 | 12           | 12           | 12           |  |
| Male                |              |                                    |              |              |              |  |
| Days of lactation 0 | 6.47 ± 0.58  | 6.45 ± 0.43                        | 6.43 ± 0.65  | 6.67 ± 0.72  | 6.45 ± 0.55  |  |
| 4                   | 10.77 ± 1.17 | 10.49 ± 1.22                       | 10.63 ± 1.55 | 10.77 ± 1.79 | 10.62 ± 1.00 |  |
| Number of dams      | 12           | 11                                 | 12           | 12           | 12           |  |
| Female              |              |                                    |              |              |              |  |
| Days of lactation 0 | 6.17 ± 0.80  | 6.12 ± 0.44                        | 6.10 ± 0.58  | 6.25 ± 0.59  | 6.18 ± 0.50  |  |
| 4                   | 10.36 ± 1.35 | 10.20 ± 1.55                       | 10.20 ± 1.30 | 10.27 ± 1.64 | 10.27 ± 1.01 |  |

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

Table 18. Necropsy finding of pups (F1) on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration

| Group<br>(mg/kg) | Control               |              | 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid |              |            |              |            |              |            |              |
|------------------|-----------------------|--------------|------------------------------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|
|                  | 0                     |              | 8                                  |              | 40         |              | 200        |              | 1000       |              |
| Number of pups   | Male<br>88            | Female<br>73 | Male<br>74                         | Female<br>80 | Male<br>85 | Female<br>88 | Male<br>86 | Female<br>84 | Male<br>81 | Female<br>97 |
| Necropsy finding | No remarkable changes |              |                                    |              |            |              |            |              |            |              |

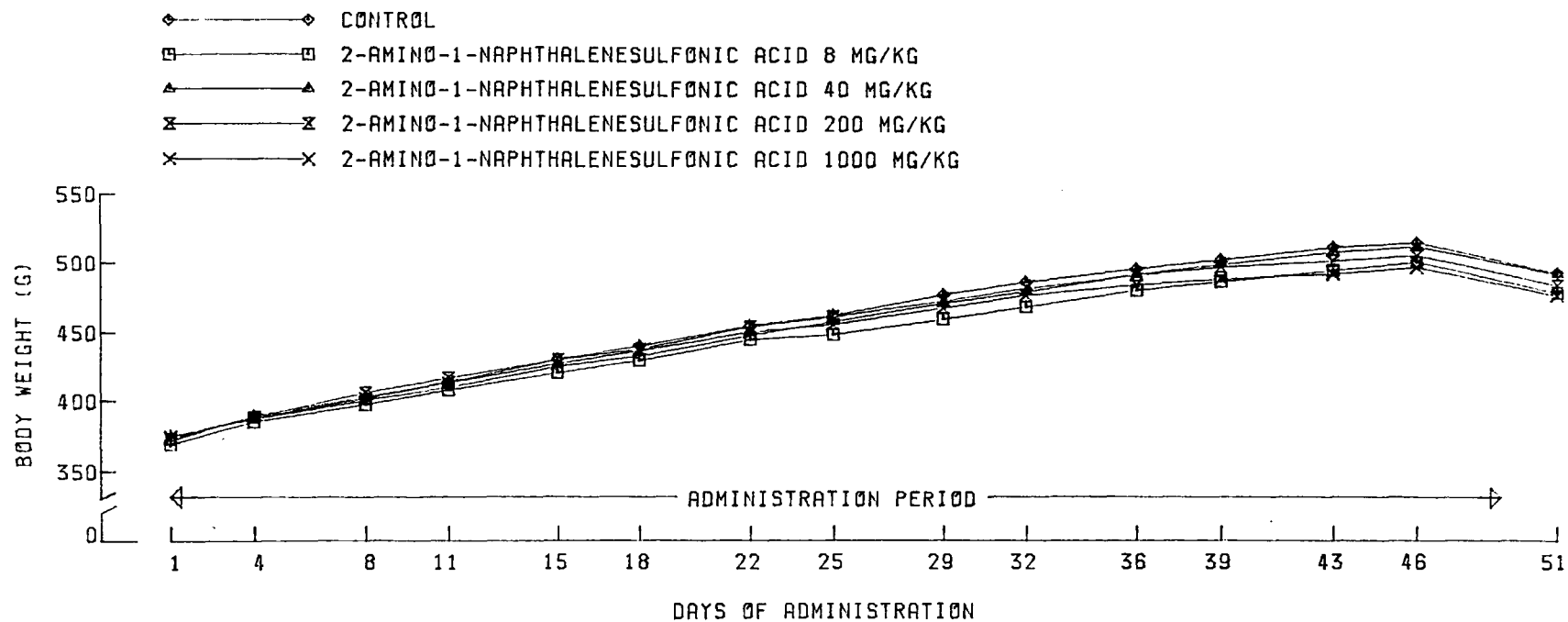


Fig. 1. Body weight of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration.

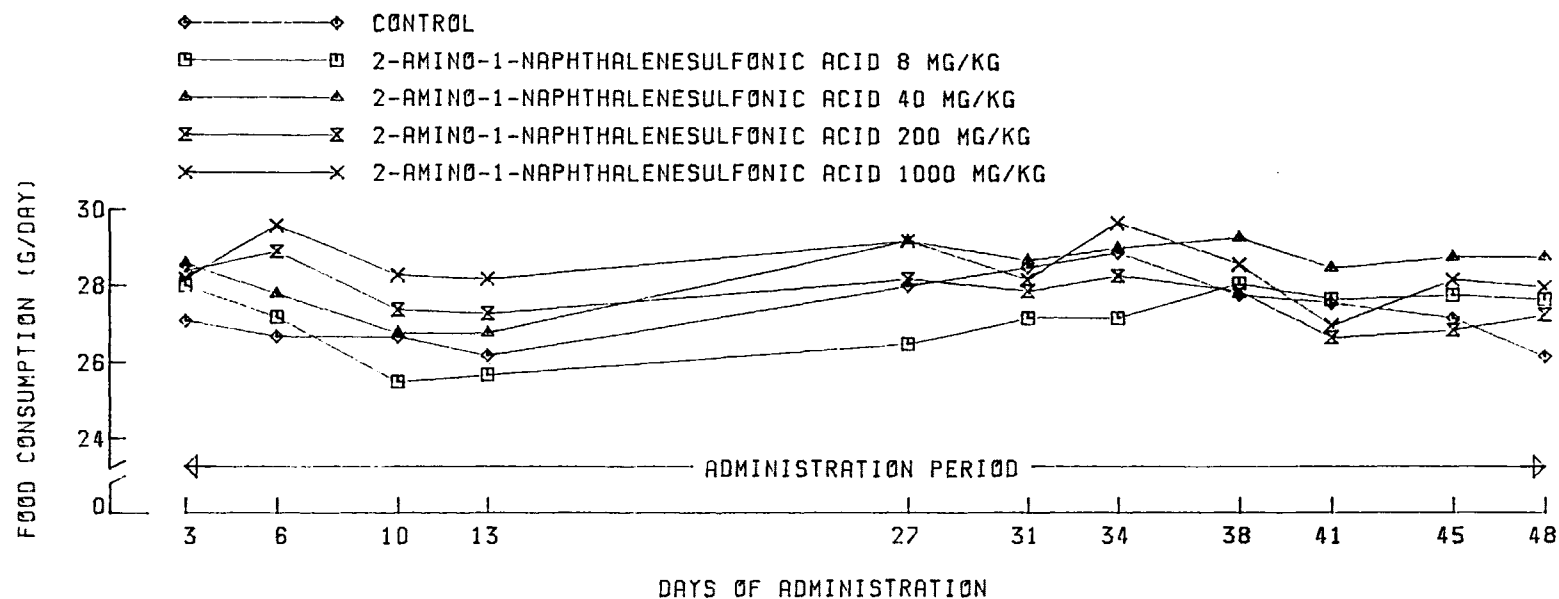


Fig. 2. Food consumption of male rats (P) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration.



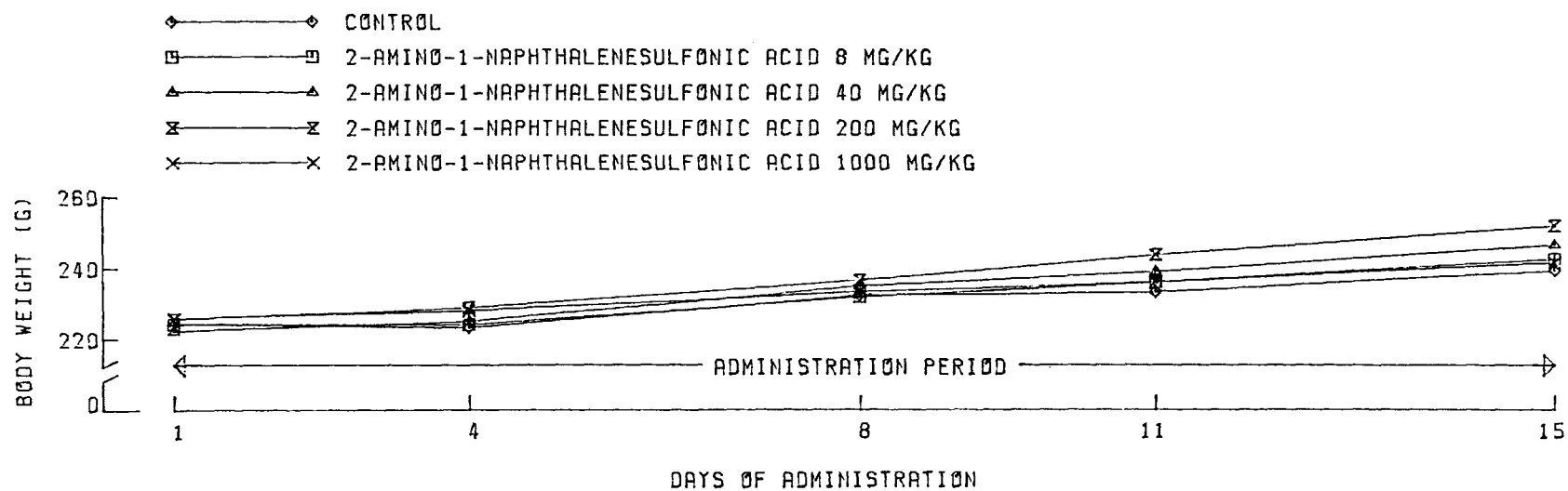


Fig. 3-1. Body weight of female rats (P) during pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration.

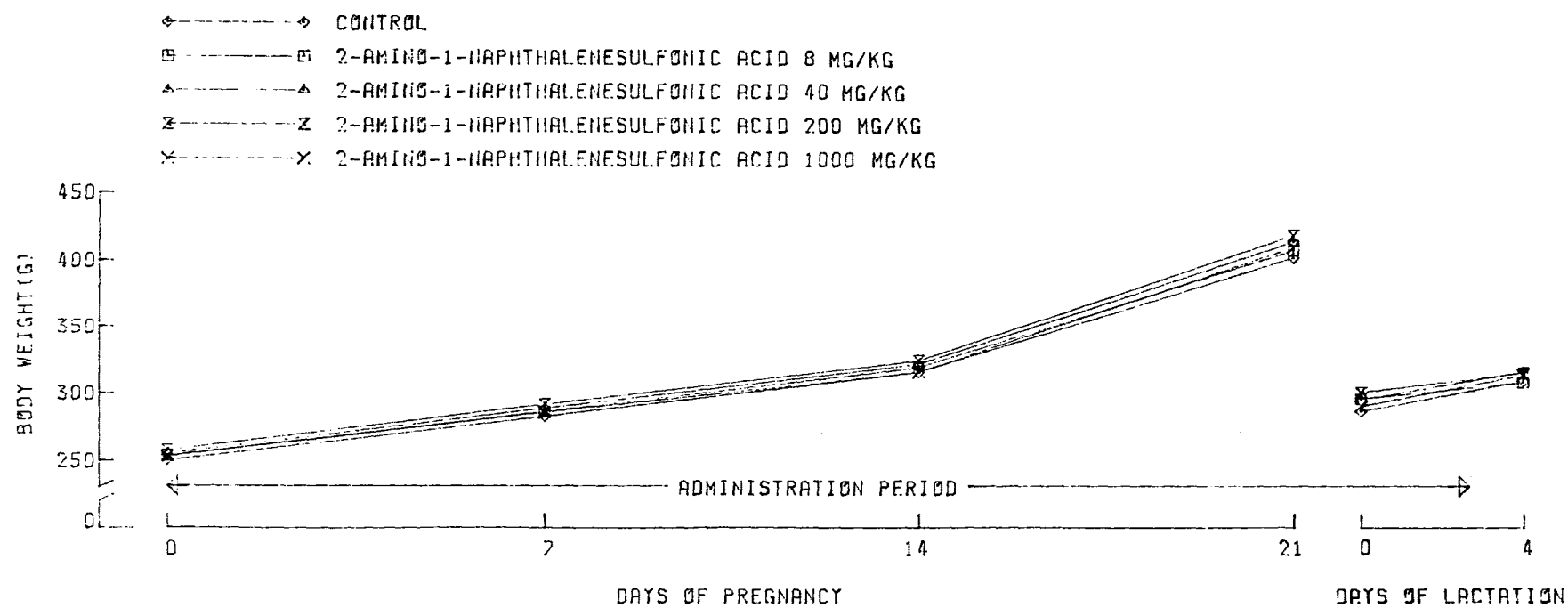


Fig. 3-2. Body weight of dams (P) during pregnancy and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration.

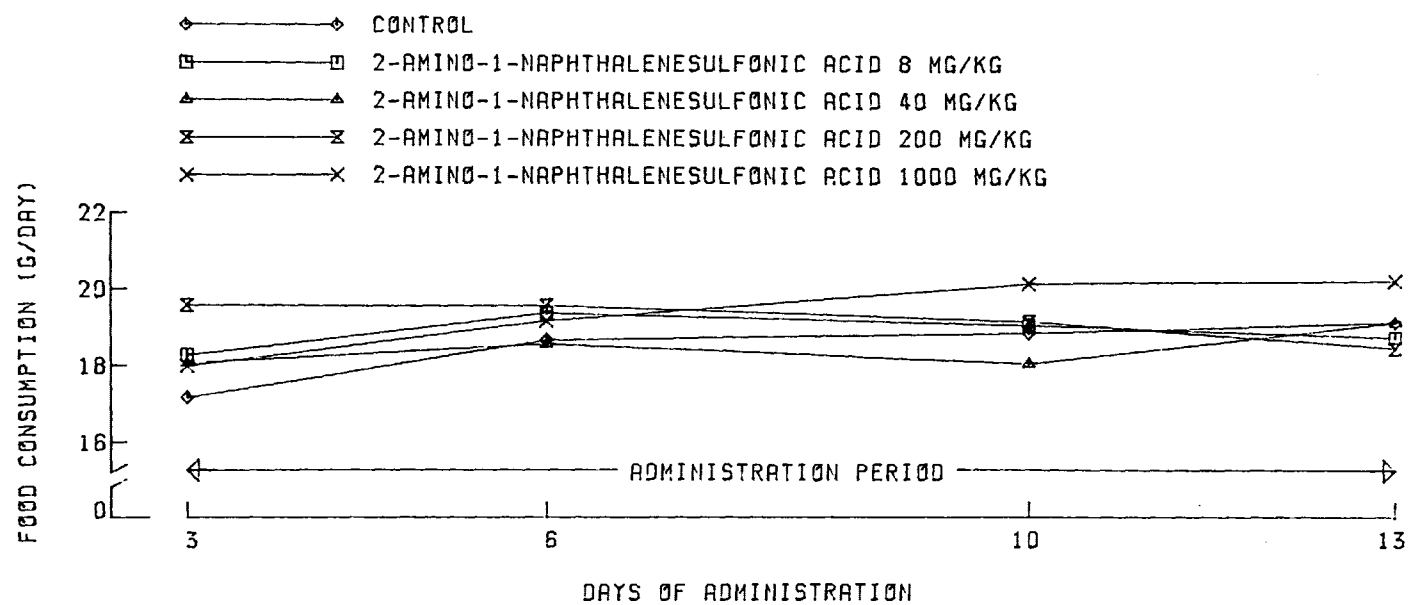


Fig. 4-1. Food consumption of female rats (P) during pre-mating period in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration.

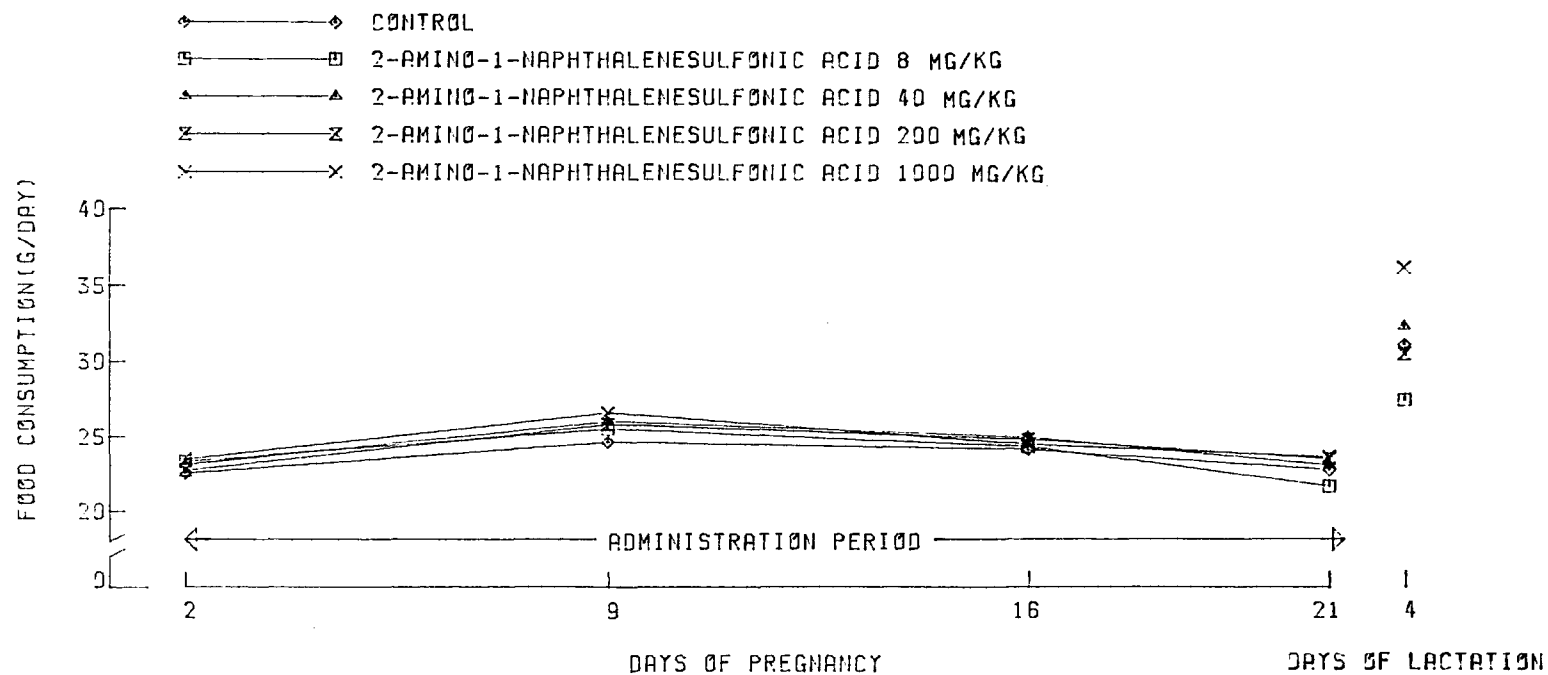


Fig. 4-2. Food consumption of dams (P) during pregnancy and lactation periods in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration.

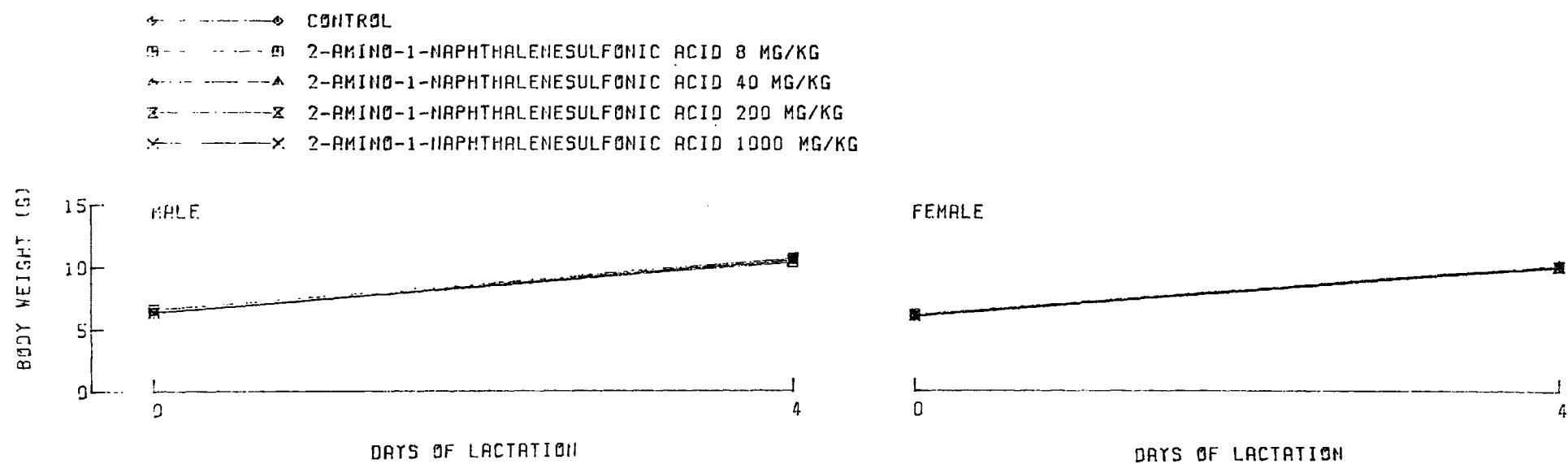


Fig. 5. Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-Amino-1-naphthalenesulfonic Acid by oral administration.