

## 最終報告書

### 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムのラットを用いる 経口投与簡易生殖毒性試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 7291

TEL 0463-82-4751

## 目次

要約 .....	5
材料と方法 .....	6
1. 被験物質 .....	6
2. 動物および飼育方法 .....	7
3. 投与検体 .....	7
1) 調製 .....	7
2) 安定性試験 .....	8
3) 含量および均一性の測定 .....	8
4. 投与量の設定および投与方法 .....	8
5. 検査法 .....	9
1) 親動物 (F <sub>0</sub> ) .....	9
2) 出生児 (F <sub>1</sub> ) .....	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) 摂餌量 .....	12
4) 器官重量 .....	12
5) 剖検所見 .....	12
6) 病理組織所見 .....	12
2. 生殖能力 .....	13
1) 性周期および交配成績 .....	13
2) 出産率および妊娠期間 .....	13
3) 分娩および哺育状態 .....	13
4) 黄体数、着床数および着床率 .....	13
3. 出生児 .....	13
1) 生存 .....	13
2) 体重 .....	13
3) 出生児観察 .....	14
考察 .....	14
参考文献 .....	15
Tables .....	20

## 要約

今回、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの雌雄動物の生殖能力に対する影響および新生児の発育に及ぼす影響を検討することを目的として、簡易生殖毒性試験を OECD 化学物質試験法ガイドラインに従って実施した。雌雄の CrI:CD (SD) ラットに被験物質を、0 (媒体:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液)、60、250 ならびに 1000 mg/kg の用量で経口投与した。雄は 42 日間投与した後に剖検し、雌は交配前 2 週間および交配期間、妊娠期間を通して哺育 3 日まで連日投与した。なお、母動物を自然分娩させ、母動物および出生児は哺育 4 日に剖検した。

### 1. 親動物所見

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

### 2. 出生児所見

出生児所見には、被験物質投与による影響は認められなかった。

### 3. 生殖発生毒性学的所見

性周期、交配成績、妊娠期間、出産率、黄体数、着床数および着床率には、被験物質投与による影響は認められなかった。

分娩および哺育状態においても、被験物質投与による影響は認められなかった。

### 4. 無毒性量

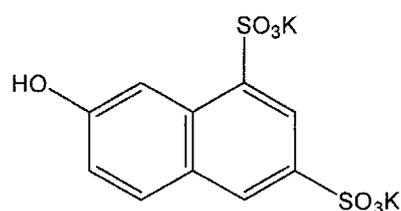
以上の成績から、本試験条件下における 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの親動物に対する一般毒性学的無毒性量は 1000 mg/kg/day で、生殖発生毒性学的な無毒性量ならびに次世代に対する無毒性量も 1000 mg/kg/day であると判断される。

## 材料と方法

### 1. 被験物質

被験物質である 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム(別名:dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate、CAS No.:842-18-2、分子式: $C_{10}H_6K_2O_7S_2$ 、分子量:380.48、外観:微黄白色、粉末、純度(無水物換算):99.9 area%(HPLC)、100.0%(イオン交換法)、水分:13.3%、

Annex A、以下、HNSP)は 使用時  
まで冷蔵・遮光下(実測値 4~7°C)にて保管した。HNSP の構造式を以下に示す。



被験物質の安定性については、本試験の投与開始前(2009年11月13日)および投与期間終了後(2010年2月22日)に臭化カリウム錠剤を作製後、フーリエ変換赤外分光光度計算(FTIR-8300、島津製作所)を用いて  $4000\text{ cm}^{-1}$ ~ $400\text{ cm}^{-1}$  の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、スペクトルに変化がないことを確認した(Annex B)。なお、投与開始前のスペクトルは、本被験物質を用いて先立って実施した単

回投与毒性試験(試験番号 A-09-025)の投与開始前の測定で得られたスペクトルを使用した。

## 2. 動物および飼育方法

日本チャールス・リバー、厚木飼育センターより、8 週齢の Sprague-Dawley 系[CrI:CD(SD)、SPF]雄ラット 62 匹、雌ラット 73 匹を購入し、5 号室に搬入した。入荷日も含め 14 日間、検疫と飼育環境への馴化を兼ねて飼育し、その間毎日、動物の一般状態を観察し、入荷日および検疫終了時に体重を測定した。検疫・馴化期間中は動物の尾にフェルトペンで馴化番号を記し、飼育ケージに試験番号、性別および馴化番号を記入した動物カードを掛けて識別した。また、雌動物については、入荷翌日から毎日、性周期を観察した。入荷日および検疫終了日(群分け日)の動物の体重は下記の通りであった。

動物入荷日	:2009 年 12 月 9 日
入荷時体重	:雄 251.4 ~ 287.3 g、雌 181.3 ~ 215.7 g
検疫終了日	:2009 年 12 月 22 日
検疫終了時体重	:雄 325.1 ~ 432.0 g、雌 217.8 ~ 275.8 g

検疫・馴化の結果、入荷した全ての動物において、検疫期間中の一般状態および体重推移に異常は認められなかった。雌動物で規則的な性周期の回帰が認められない 7 匹を除外し、体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。群分けした動物には一連の動物番号を割り当て、フェルトペンで尾に動物番号を標識し、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。群分けから棄却された雄 10 匹、雌 14 匹および性周期の結果により除外した 7 匹は余剰動物とした。これらのうち、雌 5 匹はモニタリング動物として定期病原性微生物検査に、雌 5 匹および雄 6 匹は他試験の検討にて使用した。残りの雄 4 匹および雌 11 匹は試験終了後に深麻酔下により放血し、安楽死させた。

動物は、許容温度 21.0~25.0℃、許容湿度 40.0~75.0%、換気回数約 15 回/時間、明暗サイクル 12 時間(7 時~19 時)点灯、12 時間(19 時~7 時)消灯に設定された飼育室内で、金属製金網床ケージ(220<sub>w</sub> × 270<sub>d</sub> × 190<sub>h</sub> mm)に 1 匹ずつ(交配時は 2 匹)収容し、固型飼料(CE-2、日本クリア株式会社)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。雌動物は全例について妊娠 18 日から哺育 4 日までラット用プラスチック製繁殖ケージ(350<sub>w</sub> × 400<sub>d</sub> × 180<sub>h</sub> mm)に 1 匹ずつ収容し、床敷として紙パルプ製チップ(ペパークリーン、日本エスエルシー)を適宜供給した。飼育期間中、飼育環境に異常は認められず、動物室の主任の実測値は 21.5~24.0℃、湿度の実測値は 49.0~71.0%であった。また、供給した飼料および飲料水、床敷の分析結果は、いずれも標準操作手順書に記載の許容範囲内であることを確認した。

## 3. 投与検体

### 1) 調製

HNSP を秤量し、媒体である 1%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液[CMC Na、丸石製薬(日局カルメロースナトリウム、製造番号 7213)を注射用水(光製薬、製造番号 A89AA1)で溶解]を加えて懸濁

させ、20.0 w/v%液を調製した。さらに、20.0 w/v%液を媒体で段階希釈して 5.00 および 1.20 w/v%液を調製した。調製した検体は冷蔵・遮光下で保管し(実測値 1~6°C)、調製後 8 日以内に使用した。

## 2) 安定性試験

先立って実施した本被験物質の単回投与毒性試験(試験番号:A-09-025)において、20.0 ならびに 0.0500 w/v%の本被験物質の調製検体について、冷蔵、遮光条件下で 8 日間安定性であることが確認されている(Annex C)。

## 3) 含量および均一性の測定

本試験の初回調製検体(調製日:2009年12月22日)について、20.0、5.00 および 1.20 w/v%濃度の調製検体の含量および均一性を測定した。含量の判定基準は、平均含量が調製濃度の 85.0~115%、各測定値のばらつきが平均値の 90.0~110%以内とした。その結果、平均含量は調製指示濃度の 87.7%~88.5%であり、各測定値のばらつきは平均値の 96.2~104%で規定範囲内にあった(Annex D)。

調製検体中の HNSP 濃度は以下の方法で測定した。調製検体の 0.5 mL を採取し、水で希釈して試料溶液を調製した(5 µg/mL 付近)。別に被験物質 10 mg を精密に量り、水に溶解して適宜希釈し、約 1、5 および 10 µg/mL の標準溶液を調製した。試料溶液および標準溶液を、以下に示す高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により測定し、標準溶液から作成した検量線を用いて調製検体中の HNSP 濃度を算出した。

### HPLC 条件

分析カラム	Inertsil ODS-3 (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 µm、ジーエルサイエンス)
移動相	0.1%りん酸/メタノール混液(7:3 v/v)
流量	1.0 mL/min
カラム設定温度	30°C
試料設定温度	室温
測定波長	236 nm
試料注入量	10 µL
オートインジェクタ洗浄液	水

## 4. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は既報の「7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験」<sup>1)</sup>の結果をもとに設定した。すなわち、100、300 および 1000 mg/kg の 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムを SD 系ラット雌雄各 7 匹あるいは 14 匹(0 および 1000 mg/kg 投与群は 14 日間の回復群が設けられている。)に 28 日間、反復経口投与した結果、雌では 1000 mg/kg の投与により、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の高値、網状赤血球発現率の低値が観察され、300 mg/kg および 1000 mg/kg の投与により、総コレステロールの低値が認められている。雄では、1000 mg/kg の投与により、脾臓重量の低値が認められている。さらに、14 日間の回復期間により、

雌に認められた血液生化学変化は回復したが、雄の脾臓重量は低値を示した。しかし、28 日間の反復投与により死亡動物は観察されず、一般状態、体重、摂餌量、尿検査、剖検および病理組織学的検査においても被験物質投与と関連した変化は認められていない。雌では 1000 mg/kg の 28 日反復投与により、可逆的ではあるが、末梢血液中における赤血球の増加や肝機能異常が示唆されたが、病理組織学的検査では造血系の異常あるいは肝障害を示唆する結果は得られていない。また、雄の脾臓重量の低値を示唆する血液学的変化あるいは病理組織学的変化も認められておらず、発現機序は明らかにならなかったと結論づけている。

以上のことから、本試験において 1000 mg/kg を雌雄動物に反復投与しても重篤な毒性は発現しないと判断し、本試験における高用量群の投与量を 1000 mg/kg に設定し、以下、公比約 4 で除して中間量を 250 mg/kg、低用量を 60 mg/kg とした。

雌動物は交配前 2 週間、交配期間、妊娠期間および分娩後の哺育 3 日まで(雌:総投与回数 42～54 回)、交尾は確認されたが分娩しない雌は剖検前日(妊娠 25 日相当日)まで、雄動物は交配前 2 週間、交配期間(14 日間)、剖検前日まで(雄:総投与回数 42 回)、経口的に 1 日 1 回、1 週 7 回、午前中(9 時～11 時 45 分)に投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、雄、交配前および交配中の雌は週 1 回測定する体重を基に、交尾確認雌は最新の測定日の体重を基に算出した。なお、対照群には 1%CMC Na 溶液を同様に投与した。投与経路は OECD 化学物質試験法ガイドライン[421]に抛り、ラット用胃管による強制経口投与とした。

本試験の群構成および動物番号を以下に示した。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 [% (w/v)]	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
					雄	雌
1	1%CMC Na溶液	0	0	5	M01001～M01013	F01001～F01013
2	HNSP	60	1.20	5	M02001～M02013	F02001～F02013
3	HNSP	250	5.00	5	M03001～M03013	F03001～F03013
4	HNSP	1000	20.0	5	M04001～M04013	F04001～F04013

## 5. 検査法

### 1) 親動物 (F<sub>0</sub>)

#### ①一般状態の観察

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

#### ②体重測定

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

#### ③摂餌量測定

雄動物は、投与 1～2、7～8、13～14、29～30、35～36、41～42 日に測定した。雌動物は、投与

1～2、7～8、13～14日、妊娠0～1、7～8、14～15、20～21日、哺育3～4日に測定した。

#### ④性周期観察

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

#### ⑤交配

投与15日の夕方(16時7分)より同群内の雌雄を1対1で同居させた。翌朝より毎朝、膣栓を確認し、同居中の雌の膣垢標本を作製して鏡検した。膣内に膣栓あるいは膣垢標本中に精子が確認された動物を交尾成立動物とし、この日を妊娠0日と起算して同居を解消し、個別に飼育した。交配結果および妊娠の成否により、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数、交尾率[(交尾動物数/交配に用いた動物数)×100, %]、妊娠率[(妊娠動物数/交尾した雌動物数)×100, %]を算出した。

#### ⑥妊娠・分娩・哺育状態の観察

交尾をした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。分娩状態の直接観察は観察可能な動物について行い、直接観察できなかった動物についても分娩後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。分娩後は哺育状態を哺育1～4日の間、毎日観察した。分娩した全例の妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を求め、各群の出産率[(生児出産雌数/妊娠動物数)×100, %]を算出し、哺育4日目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、脾臓、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固定(長期保存は0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液)し、脾臓、前立腺、精囊/凝固腺および乳腺は0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定した。脾臓、精巣および精巣上体は、対照群および1000 mg/kg投与群について病理組織学的検査を実施した。

雌動物のうち、分娩した雌は哺育4日に、交尾はしたが分娩しなかった雌は妊娠26日相当日に、それぞれ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させて剖検し、脾臓および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て、着床率[(着床数/妊娠黄体数)×100, %]を算出した。また、乳腺、子宮、膣および卵巣は0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定し、脾臓および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、剖検時に異常の認められた60および250 mg/kg投与群の脾臓についても同様に固定し、病理組織学検査を実施した。なお、剖検時に子宮角の一部が拡張し、子宮内に胎盤が残存していた子宮組織については、他の生殖関連検査項目の結果からHNSP投与による変化

ではないと判断し、固定保存はしたが病理組織学的観察は実施しなかった(後述)。

## 2) 出生児(F<sub>1</sub>)

### 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[(産児数/着床痕数)×100, %]、生児出産率[(出産生児数/着床痕数)×100, %]、および出生率を[(出産生児数/産児数)×100, %]を算出した。哺育 1~4 日まで、毎日、一般状態を観察し、生存児数と死亡児数を雌雄別に数え、新生児生存率[(哺育 4 日の生児数/哺育 0 日の生児数)×100, %]を算出した。生存児については、哺育 0 および 4 日に個別の体重を測定し、腹ごとに雌雄別の平均体重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[(雄生児数/総生児数)×100, %]を算出した。

### ②剖検

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

## 6. データの解析法

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

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

その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を 1 標本として、先ず、Bartlett の方法により各群の分散の一様性について検定(有意水準:5%)を行う。分散が一様である場合には、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様でない場合には、Kruskal-Wallis の順位検定(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められる場合には、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 4, Appendix 1 ~ Appendix 4)

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

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

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

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

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

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

雄では、60 mg/kg 投与群において脾臓の相対重量が対照群と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に低値を示した。精巣および精巣上体重量には対照群とHNSP各投与群との間に有意差は認められなかった。

雌の脾臓および卵巣重量には、対照群とHNSP各投与群との間に有意差は認められなかった。

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

雄では、対照群の2例(動物番号 M01008、M01013)の両側の精巣が水腫様および小型化であり、精巣上体も両側が小型化であった。

雌では、60 mg/kg 投与群の1例(動物番号 F02007)の脾臓中央部が変形していた。また、250 mg/kg 投与群の1例(動物番号 F03011)で、右子宮角が一部拡張し子宮角内には胎盤が2つ遺残していた。出産時に子宮内に胎盤が遺残したことにより、子宮角の一部が拡張したと考えられた。しかし、この動物を含め、全ての動物の分娩状態、哺育状態に異常がないことから、HNSP投与による影響ではないと判断し、子宮の病理組織学的検査は実施しなかった。なお、この動物の脾臓は大型化を呈していた。

#### 6) 病理組織所見 (Table 17, Table 18, Appendix 17, Appendix 18)

脾臓では、雌雄ともに、対照群および1000 mg/kg 投与群の全例に髄外造血および褐色色素の沈着が観察されたが、両群間に頻度および程度に差はなかった。剖検時に脾臓中央部の変形が認められた60 mg/kg 投与群の雌1例では、限局性の被膜下の線維化が認められた。同例では髄外造血および褐色色素の沈着が観察されたが、対照群と比較して程度に差はなかった。また、剖検時に脾臓の大型化が

認められた 250 mg/kg 投与群の雌 1 例では、中等度の髄外造血およびごく軽度の褐色色素の沈着が観察された。

精巣では、対照群の 5 例および 1000 mg/kg 投与群の 3 例に精細管萎縮が観察された。このうち剖検時に精巣が水腫様で小型化が認められた対照群 2 例では、中等度あるいは重度の精細管萎縮が観察され、間細胞の過形成も認められた。

精巣上部には、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 3 例に管腔内に少数の細胞残屑が観察された。また、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例に精子肉芽腫が観察され、間質にごく軽度のリンパ球浸潤を伴っていた。また、剖検時に異常所見が認められた対照群の 2 例では、中等度あるいは重度の管腔内の精子の減少が観察された。

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

## 2. 生殖能力

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

性周期には、HNSP 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

交配の結果、全ての動物は交配期間中に交尾が確認された。交尾は確認されたが不妊であった動物が、対照群に 2 例認められた(動物番号 F01008、F01013)。しかし、受胎率、交尾までに要した日数およびその間の発情回数には、対照群と HNSP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

### 2) 出産率および妊娠期間 (Table 21, Appendix 21)

対照群の 2 例が出産しなかった(後述)。他の動物は妊娠 22~23 日に出産し、出産率および妊娠期間には対照群と HNSP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

### 3) 分娩および哺育状態

出産した全ての動物の分娩および哺育状態に異常は観察されなかった。

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

対照群の 2 例(動物番号 F01008、F01013)は、妊娠 25 日相当日までに分娩が確認されなかった。妊娠 26 日相当日に剖検した結果、着床が確認されなかったことから不妊であると判断し、妊娠期以降の成績は全て評価対象から除外した。その他、黄体数、着床数および着床率には、対照群と HNSP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

## 3. 出生児

### 1) 生存 (Table 21, Appendix 21)

分娩率、生児出産率、出生率および性比には、対照群と HNSP 投与群との間に有意差は認められなかった。HNSP 各投与群の生後 4 日までの新生児生存率が対照群と比較して有意に増加した。

### 2) 体重 (Table 22, Appendix 22)

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

かった。

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

哺育 0～4 日における出生児の一般状態には異常は認められず、生存児に外表奇形にも異常は観察されなかった。また、哺育 4 日に剖検した結果、異常は認められなかった。

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

死亡児には母動物による食害により存在が不明になったと推察される児 (不明児)、あるいは自己融解により内臓観察ができなかった死亡児を含むが、剖検が可能であった死亡児には外表奇形は観察されず、内臓観察が可能であった死亡児についても内部器官に異常は認められなかった。

## 考察

雌雄ラットの交配前 (2 週間) および交配期間中ならびに、雄では交配期間終了後、計 42 日間、雌では妊娠期間を通して周産期 (哺育 4 日まで) に HNSP を経口投与し、雌雄ラットに対する生殖毒性について検討した。

試験期間中、雌雄ともに一般状態、体重、摂餌量には、HNSP 投与による変化は認められなかった。

剖検時に、雄の 60 mg/kg 投与群のみで脾臓の相対重量が対照群と比較して有意な低値を示した。同化学物質を用いたラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験<sup>1)</sup>では、1000 mg/kg の HNSP 投与により、脾臓重量の低下が観察されている。しかし、本試験の脾臓重量の変化は用量依存的な変化ではなく、雌の脾臓重量に影響は認められていない。また、雌の 60 mg/kg 投与群の 1 例の脾臓の中央部が変形し、病理組織学的検査では限局性の被膜下の線維化が認められた。しかし、他の動物には同様の変化は認められていないこと、脾臓には HNSP 投与によると考えられる病理組織学的変化は観察されていないことから、これらの脾臓の変化は偶発的な変化と考えられた。

雌の 250 mg/kg 投与群の 1 例の右子宮角が一部拡張し、子宮角内には胎盤が 2 つ遺残していた。しかし、同群の他の動物および 1000 mg/kg 投与群には同様の変化は認められておらず、HNSP 投与群のいずれの動物にも分娩状態および哺育状態に異常は認められていないことから、偶発的な所見であり、HNSP 投与により分娩困難あるいは分娩遅延といった分娩障害が発現したものではないと判断した。HNSP 各投与群の精巣、精巣上体および卵巣の剖検所見および病理組織学的所見には HNSP 投与による変化はなかった。

交尾率、受胎率、黄体数、着床数および着床率には HNSP 投与による影響は認められなかった。また、分娩および哺育にも HNSP 投与による影響はなかった。生後 4 日までの新生児生存率が HNSP 各投与群において対照群と比較して高値を示したが、対照群において 2 例不妊がいたことに起因した毒性学的に意味のない変化であり、児の生存率、体重にも HNSP 投与による影響はないと考えられた。

以上の結果から、本試験条件下における HNSP の親動物に対する一般毒性学的毒性量は 1000 mg/kg/day、雌雄動物に対する生殖発生毒性的な無影毒性量ならびに次世代に対する無毒性量

も 1000 mg/kg/day であると推定された。

#### 参考文献

- 1) 7-ヒドロキシ-1,3-ナフトレンジスルホン酸カリウムのラットを用いる 28 日間反復経口毒性試験  
([http://dra4.nihs.go.jp/mhlw\\_data/home/paper/paper842-18-2b.html](http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper842-18-2b.html))



Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 2. General conditions of female rats

Group	Number of females and general conditions	Days of administration																											
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1% CMC Na	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
HNSP 60 mg/kg	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
HNSP 250 mg/kg	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
HNSP 1000 mg/kg	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 2 (continued). General conditions of female rats

Group	Number of females and general conditions	Days of administration																													
		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26		27		28		29	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1% CMC Na	Number of females	13	13	13	11	11	8	8	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	11	11	8	8	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
HNSP 60 mg/kg	Number of females	13	13	13	9	9	8	8	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	9	9	8	8	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
HNSP 250 mg/kg	Number of females	13	13	13	8	8	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	8	8	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
HNSP 1000 mg/kg	Number of females	13	13	13	11	11	6	6	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	11	11	6	6	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 3. General conditions in dams during pregnancy

Group	Number of dams and general conditions	Days of pregnancy																											
		0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1% CMC Na	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
	General appearance, No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
HNSP 60 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
HNSP 250 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
HNSP 1000 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		

Pre: Before administration, Post: after administration.

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

Group	Number of dams and general conditions	Days of pregnancy																											
		14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26			
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
1% CMC Na	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0			
	General appearance, No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0			
HNSP 60 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0				
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0				
HNSP 250 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0				
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0				
HNSP 1000 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0				
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0				

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 4. General conditions in dams during lactation

Group	Number of dams and general conditions	Days of lactation									
		0		1		2		3		4	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1% CMC Na	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	General appearance, No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
HNSP 60 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
HNSP 250 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
HNSP 1000 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 5. Body weights of male rats

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of males	13	13	13	13
Days of administration				
1	381.7 ± 18.0	377.6 ± 16.0	372.0 ± 12.5	382.5 ± 14.4
7	409.7 ± 17.3	407.0 ± 19.0	400.1 ± 17.6	411.4 ± 14.8
14	439.0 ± 21.8	433.4 ± 22.9	424.0 ± 20.2	439.8 ± 15.9
21	457.6 ± 23.1	452.9 ± 25.9	448.0 ± 23.9	459.1 ± 18.3
28	483.5 ± 25.4	480.6 ± 30.8	475.4 ± 31.7	483.3 ± 22.7
35	505.7 ± 27.7	502.8 ± 34.2	498.1 ± 34.9	505.0 ± 25.1
42	516.4 ± 32.1	514.8 ± 40.9	508.5 ± 37.0	517.1 ± 27.2

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 6. Body weights of female rats

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
1	245.5 ± 9.0	245.8 ± 8.1	243.5 ± 9.6	244.9 ± 7.3
7	257.3 ± 11.0	258.9 ± 12.4	257.7 ± 9.9	256.0 ± 13.1
14	269.5 ± 14.9	270.3 ± 12.9	268.3 ± 11.8	268.1 ± 12.6

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 7. Body weights in dams during pregnancy

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of dams	11	13	13	13
Days of pregnancy				
0	284.2 ± 21.6	279.4 ± 11.4	276.9 ± 12.8	278.6 ± 13.1
7	320.9 ± 19.7	312.1 ± 11.0	310.0 ± 14.4	309.7 ± 15.8
14	354.1 ± 17.9	348.4 ± 13.2	342.9 ± 17.2	341.6 ± 19.3
21	444.0 ± 24.2	441.8 ± 18.0	434.5 ± 21.2	437.8 ± 23.1

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 8. Body weights in dams during lactation

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of dams	11	13	13	13
Days of lactation				
0	318.1 ± 20.3	312.9 ± 17.2	306.1 ± 25.8	309.7 ± 23.2
4	349.5 ± 14.8	347.0 ± 14.4	333.4 ± 19.5	336.9 ± 18.1

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 9. Food consumption of male rats

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of males	13	13	13	13
Days of administration				
1	28.4 ± 3.2	28.9 ± 3.3	26.7 ± 2.4	28.5 ± 3.6
7	29.6 ± 1.6	29.0 ± 2.9	29.3 ± 2.3	30.9 ± 2.0
13	29.7 ± 2.6	29.5 ± 2.6	29.3 ± 3.6	30.5 ± 1.4
29	29.7 ± 2.3	28.9 ± 2.1	30.0 ± 3.1	29.7 ± 1.9
35	30.4 ± 2.1	30.2 ± 3.0	30.9 ± 4.0	31.8 ± 2.6
41	28.4 ± 3.3	27.9 ± 2.8	29.5 ± 8.4	29.6 ± 3.1

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 10. Food consumption of female rats

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
1	21.5 ± 3.7	21.1 ± 2.7	21.7 ± 2.7	20.3 ± 3.1
7	22.1 ± 2.4	22.2 ± 2.6	20.4 ± 3.8	21.1 ± 2.2
13	22.3 ± 3.9	21.3 ± 2.6	22.1 ± 3.1	22.4 ± 2.2

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 11. Food consumption in dams during pregnancy

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of dams	11	13	13	13
Days of pregnancy				
0	21.1 ± 3.2	20.8 ± 2.8	21.8 ± 3.3	22.7 ± 3.2
7	27.4 ± 2.5	26.5 ± 2.3	26.3 ± 3.0	26.2 ± 2.9
14	26.9 ± 4.3	26.6 ± 2.5	26.4 ± 2.3	25.7 ± 2.7
20	21.9 ± 7.7	22.1 ± 3.6	21.5 ± 5.2	23.4 ± 3.2

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 12. Food consumption in dams during lactation

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg	
Number of dams	11	13	13	13	
Days of lactation	3	46.0 ± 5.2	47.6 ± 3.4	45.2 ± 7.6	47.3 ± 4.1

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 13. Organ weights of male rats

Group		1% CMC Na		HNSP 60 mg/kg		HNSP 250 mg/kg		HNSP 1000 mg/kg	
Number of males		13		13		13		13	
Body weight	(g)	516.1	± 32.4	518.3	± 40.7	508.7	± 38.3	515.5	± 27.1
Spleen	(mg)	894.1	± 93.5	805.7	± 111.5	912.7	± 77.1	853.0	± 92.4
	(mg/g)	1.734	± 0.167	1.555	± 0.173 *	1.800	± 0.157	1.655	± 0.160
Testes	(mg)	2937.7	± 762.8	3150.3	± 128.8	3286.8	± 331.2	3144.0	± 287.0
	(mg/g)	5.744	± 1.601	6.109	± 0.483	6.521	± 1.048	6.117	± 0.670
Epididymides	(mg)	1103.7	± 227.9	1157.3	± 53.7	1173.3	± 92.6	1199.9	± 90.5
	(mg/g)	2.153	± 0.476	2.245	± 0.193	2.326	± 0.314	2.333	± 0.209

Each value shows mean ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 14. Organ weights of female rats

Group		1% CMC Na		HNSP 60 mg/kg		HNSP 250 mg/kg		HNSP 1000 mg/kg	
Number of females		11		13		13		13	
Body weight	(g)	349.5	± 14.8	347.0	± 14.4	333.4	± 19.5	336.9	± 18.1
Spleen	(mg)	716.2	± 91.7	738.6	± 112.0	755.4	± 140.8	763.0	± 128.1
	(mg/g)	2.052	± 0.266	2.130	± 0.319	2.269	± 0.433	2.260	± 0.322
Ovaries	(mg)	112.6	± 9.2	104.1	± 11.7	101.4	± 12.7	106.9	± 14.3
	(mg/g)	0.323	± 0.025	0.300	± 0.031	0.304	± 0.030	0.317	± 0.029

Each value shows mean ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 15. Macroscopic findings in males

Findings	Group Grade	1% CMC Na		HNSP 60 mg/kg		HNSP 250 mg/kg		HNSP 1000 mg/kg	
		-	P	-	P	-	P	-	P
Epididymis									
Small, bilateral		11	2	13	0	13	0	13	0
Testis									
Edematous, bilateral		11	2	13	0	13	0	13	0
Small, bilateral		11	2	13	0	13	0	13	0

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

Numerals represent the number of animals.

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 16. Macroscopic findings in females

Findings	Group Grade	1% CMC Na		HNSP 60 mg/kg		HNSP 250 mg/kg		HNSP 1000 mg/kg	
		-	P	-	P	-	P	-	P
Spleen									
Deformity		11	0	12	1	13	0	13	0
Enlargement		11	0	13	0	12	1	13	0
Uterus									
Placental remnant		11	0	13	0	12	1	13	0

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

Numerals represent the number of animals.



Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 18. Histopathological findings in females

Findings	Group Grade	1% CMC Na						HNSP 60 mg/kg						HNSP 250 mg/kg						HNSP 1000 mg/kg									
		-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE
<b>Spleen</b>																													
Deposit, pigment, brown		0	11	0	0	0			0	1	0	0	0	12			0	1	0	0	0	12			0	13	0	0	0
Fibrosis, focal, subcapsule		11	0	0	0	0			0	1	0	0	0	12			1	0	0	0	0	12			13	0	0	0	0
Hematopoiesis, extramedullary		0	3	4	4	0			0	1	0	0	0	12			0	0	0	1	0	12			0	3	7	3	0
<b>Ovary</b>		11												13															

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

P: Non-graded change NE: Not examined

Numerals represent the number of animals.

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 19. Results of observations about estrous cycle

Group	1%CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of animals examined	13	13	13	13
<u>Pre-treatment period</u>				
Number of animals showing the each type of regular estrous cycle				
4-day cycle	9	10	10	10
4 and 5-day cycle	3	3	1	1
5-day cycle	1	0	2	2
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D.	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.4
<u>Treatment period</u>				
Number of animals showing each type of cycle				
4-day cycle	10	11	12	10
4 and 5-day cycle	2	2	1	1
5-day cycle	1	0	0	2
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D.	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.4
Frequency of animals of which type of estrus cycle was changed after the treatment				
	1 / 13	3 / 13	3 / 13	2 / 13
Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean±S.D.	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 20. Results of observations about reproductive performance

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of mated pairs [A]	13	13	13	13
Number of copulated pairs [B]	13	13	13	13
Copulation index [(B/A)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile males [C]	11	13	13	13
Fertility index [(C/B)×100,%]	84.6	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation ; Mean±S.D.	3.5 ± 3.0	2.5 ± 1.1	1.9 ± 1.0	2.6 ± 1.1

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 21. Observation of offspring (F<sub>1</sub>)

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of dams	11	13	13	13
Gestation length (days)				
Mean ± S.D. per dam	22.3 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5
Number of corpora lutea				
Total	184	213	208	209
Mean ± S.D. per dam	16.7 ± 1.7	16.4 ± 1.7	16.0 ± 1.8	16.1 ± 2.3
Number of implantation scars				
Total	167	198	200	201
Mean ± S.D. per dam	15.2 ± 3.3	15.2 ± 1.9	15.4 ± 2.0	15.5 ± 2.2
Implantation index (%) <sup>a)</sup>	91.4 ± 19.5	93.2 ± 10.3	96.1 ± 7.4	96.4 ± 5.1
Gestation index (%) <sup>b)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of offspring at birth				
Total	156	191	185	186
Mean ± S.D. per dam	14.2 ± 3.5	14.7 ± 1.7	14.2 ± 1.9	14.3 ± 2.3
Number of live offspring at birth				
Male	81	85	89	86
Female	75	106	94	100
Total	156	191	183	186
Mean ± S.D. per dam	14.2 ± 3.5	14.7 ± 1.7	14.1 ± 2.1	14.3 ± 2.3
Sex ratio <sup>c)</sup>				
Mean ± S.D. per dam	0.53 ± 0.09	0.45 ± 0.14	0.49 ± 0.13	0.47 ± 0.12
Number of stillbirths				
Total	0	0	2	0
Mean ± S.D. per dam	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.6	0.0 ± 0.0
Delivery index <sup>d)</sup>				
Mean% ± S.D. per dam	92.8 ± 8.4	96.7 ± 4.1	92.8 ± 7.2	92.5 ± 6.4
Birth index <sup>e)</sup>				
Mean% ± S.D. per dam	92.8 ± 8.4	96.7 ± 4.1	91.8 ± 10.1	92.5 ± 6.4
Live birth index <sup>f)</sup>				
Mean% ± S.D. per dam	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	98.7 ± 4.6	100.0 ± 0.0
Number of offspring on day 4				
Male	76	85	88	86
Female	74	105	94	99
Sex ratio <sup>c)</sup>				
Mean ± S.D. per dam	0.51 ± 0.09	0.45 ± 0.14	0.49 ± 0.13	0.47 ± 0.12
Viability index <sup>g)</sup>				
Mean% ± S.D. per dam	96.1 ± 5.6	99.5 ± 1.6 *	99.5 ± 1.9 *	99.5 ± 2.0 *
Number of external abnormalities <sup>h)</sup>				
	0	0	0	0

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 22. Body weights of offspring (F<sub>1</sub>)

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Number of dams	11	13	13	13
Male				
Days after birth				
0	6.5 ± 1.0	6.8 ± 0.5	6.6 ± 0.5	6.7 ± 0.5
4	11.1 ± 2.4	11.0 ± 0.9	10.9 ± 0.9	11.0 ± 1.2
Female				
Days after birth				
0	6.4 ± 1.0	6.4 ± 0.5	6.2 ± 0.4	6.4 ± 0.5
4	10.6 ± 2.2	10.4 ± 0.8	10.3 ± 0.8	10.6 ± 1.1

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

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 23. General conditions in offspring (F<sub>1</sub>)

Group	Number of offspring and general conditions	Days after birth				
		0	1	2	3	4
1% CMC Na	Number of offspring	156	156	151	151	150
	General appearance, No abnormality	156	151	151	150	150
	General appearance, Death		5		1	
HNSP 60 mg/kg	Number of offspring	191	191	190	190	190
	General appearance, No abnormality	191	190	190	190	190
	General appearance, Death		1			
HNSP 250 mg/kg	Number of offspring	183	183	182	182	182
	General appearance, No abnormality	183	182	182	182	182
	General appearance, Death		1			
HNSP 1000 mg/kg	Number of offspring	186	186	185	185	185
	General appearance, No abnormality	186	185	185	185	185
	General appearance, Death		1			

Reproduction/developmental toxicity screening test of dipotassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate hydrate by oral administration in rats.

Table 24. Morphological findings of offspring (F<sub>1</sub>)

Group	1% CMC Na	HNSP 60 mg/kg	HNSP 250 mg/kg	HNSP 1000 mg/kg
Dead offspring				
Number of dead offspring <sup>a)</sup>	6	1	3	1
Number of missing offspring	4	1	1	1
Number of dead offspring examined	2	0	2	0
Number of dead offspring with external changes	0	0	0	0
Number of dead offspring with visceral changes	0	0	0	0
Live offspring				
Number of live offspring examined (postnatal day 0)	156	191	183	186
Number of live offspring with external changes	0	0	0	0
Number of live offspring examined (postnatal day 4)	150	190	182	185
Number of live offspring with external changes	0	0	0	0
Number of live offspring with visceral changes	0	0	0	0

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

<sup>a)</sup> including missing offspring