最終報告書

試験表題:2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いた 経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号:R-1057

試験期間: 2010年6月29日~2011年6月30日

試験施設 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

> 株式会社ボゾリサーチセンター 〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

5.5

5.6

5.7

1.	目次		3
_	-14 tre		•
3.	安約)
4.	緒言	10)
••	711 11		•
5.	試験	材料及び方法1	1
	5.1	被験物質及び媒体1	
	5.1.1	被験物質1	
	5.1.2	媒体	
	5.2	投与液の調製及び保存方法	
	5.2.1 5.2.2	媒体の調製12 被験物質投与液の調製及び保存12	
	5.2.3	被験物質投与液の安定性	
	5.2.4	被験物質投与液の濃度及び均一性確認	
	5.3	試験動物種及び系統の選択理由	
	5.4	試験動物1	

動物の識別.......14

	5.8	投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由	. 15
	5.9	投与方法	. 15
	5.10	投与量及び群構成	. 15
	5.11	投与量の設定根拠	. 15
	5.12	観察及び検査の方法	. 16
	5.12.1	一般状態の観察	. 16
	5.12.2	2 体重測定	. 16
	5.12.3	3 摂餌量測定	. 16
	5.12.4	4	. 16
	5.12.5	5 交配方法	. 17
	5.12.€	5 分娩及び哺育観察	.17
	5.12.7	7 出生児の観察及び測定	. 17
	5.12.8	3 病理学検査	.17
	5.13	統計解析	. 18
	5.13.	l パラメータの算出	. 18
	5.13.2	2	. 19
6.	試験網	洁果	.20
	6.1	一般状態(Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)	
	6.2	体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)	
	6.3	摂餌量(Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)	
	6.4	器官重量(Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-8)	
	6.5	剖検所見(Table 5-1、5-2、Appendix 5-1~5-96)	. 20
	6.6	病理組織学検査(Table 6-1、6-2、Appendix 5-1~5-96)	
	6.7	性周期(Table 7、Appendix 6-1~6-4)	
	6.8	交配成績(Table 8、Appendix 7-1~7-4)	
	6.9	分娩成績(Table 9、Appendix 8-1~8-4)	
	6.10	出生児の性比及び外表観察(Table 10、Appendix 9-1~9-4)	
	6.11	出生児の生存率(Table 11、Appendix 10-1~10-4)	
	6.12	出生児の体重(Table 12、Appendix 11-1~11-4)	
	6.13	出生児の生後 4 日剖検所見(Table 13、Appendix 12-1~12-4)	
7.			
	7.1	雌雄動物に対する影響	
	7.2	生殖発生に対する影響	
8.	文献		24

义

 Fig. 1、2
 体重

 Fig. 3、4
 摂餌量

表

Table 1-1~1-4一般状態Table 2-1~2-4体重Table 3-1~3-4摂餌量Table 4-1、4-2器官重量Table 5-1、5-2剖検所見

Table 6-1、6-2 病理組織学検査

Table 7性周期Table 8交配成績Table 9分娩成績

Table 10 出生児の性比及び外表観察

Table 11出生児の生存率Table 12出生児の体重

Table 13 出生児の生後 4 日剖検所見

3. 要約

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸を 0(対照群: 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液)、100、300 及び 1000 mg/kg/day の投与量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 4 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に生殖発生毒性について概略的に検討した。

4. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室の委託により、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験を実施したので、その成績を報告する。

5. 試験材料及び方法

5.1 被験物質及び媒体

5.1.1 被験物質

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は

以下の

情報とともに購入した。また、試験開始前に赤外吸収スペクトルの測定により特性が確認されている。¹⁾

名称: 2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸

英語名称 : 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzene sulfonic Acid

別名: 5-アミノ-2-クロロトルエン-4-スルホン酸

3-2024

CAS番号 : 88-53-9

構造式又は示性式 :

官報公示整理番号

$$H_2N$$
 CH_3
 CI
 SO_3H

分子式 : C₇H₈CINO₃S

分子量 : 221.66

常温における性状 : うすい赤黄色~うすい赤色の結晶性粉末

溶解性 : 難溶;水(0.2 g/100 mL、20°C)

純度 (HPLC) : 99.9 area%

純度(中和滴定): 98.0%

不純物 : 不明

熱水酸化ナトリウム溶液溶状

: わずかな微濁

入手量 : 1025 g (500 g; 2 本、25 g; 1 本)

保存方法 : 密栓、冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内(許容値:1~10℃、

実測値:2~8°C)に保存した。〕

保存場所 : 御殿場研究所被験物質保存室及び第2研究棟4階被験

物質調製室

取扱い上の注意 : 作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護

手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。

安定性 : 投与期間終了後、残余被験物質の赤外吸収スペクトル

を確認した結果、実験実施前に確認した参照スペクトル ¹⁾とほぼ同様であり、投与期間を通して被験物質は

安定であったと判断した。

残量の処理 : 被験物質 5 g を保存試料として御殿場研究所被験物質

保存室に保存した。動物試験及び分析終了後の残量は

すべて焼却処分した。

5.1.2 媒体

名称: 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水

溶液

なお、媒体については、先に実施された「2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いる 28 日間の反復投与毒性試験」²⁾において投与液の媒体として用いられた 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液を選択するとともに陰性対照物質として対照群の投与に使用した。

5.2 投与液の調製及び保存方法

5.2.1 媒体の調製

必要量のカルボキシメチルセルロース・ナトリウム(和光純薬工業株式会社、ロット番号:PEK3623)を秤取し、注射用水(日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号:0C80、0D91)を加えて溶解した。本溶液をメスシリンダーに移し、更に注射用水を加え 0.5 w/v%となるよう調製した。

5.2.2 被験物質投与液の調製及び保存

濃度ごとに必要量の被験物質を秤取し、乳鉢中で媒体と混合、懸濁させた後、メスシリンダーに移し、更に媒体を加え規定濃度(20、60及び 200 mg/mL)となるよう調製した。投与液は、最大 7日分を一括して調製し、1日使用分ごと褐色ガラス瓶に小分けして冷所(冷蔵庫内、許容値:1~10°C、実測値:4~8°C)に保存し、調製日を含め8日以内の投与に使用した。

5.2.3 被験物質投与液の安定性

本被験物質を含む 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液を媒体とする投与液は、冷蔵庫保存で 2 週間安定であることが、28 日間反復投与毒性試験実施設(財団法人食品農医薬品安全性評価センター)において確認されている。

5.2.4 被験物質投与液の濃度及び均一性確認

雄の投与1週と投与6週の2回、投与に用いる各濃度の投与液について、投与に使用する前にHPLC法により濃度を確認した。その結果、規定濃度に対する各投与液の測定濃度の割合は104.5~110.0%、変動係数(CV)は0.5~6.2%であり、いずれも許容範囲内(濃度:表示値に対する割合;100.0±10.0%、均一性:CV10.0%以内)であった。なお、濃度測定は当試験施設において確立された分析法¹⁾に従い、用いた標準物質、HPLCシステム及び測定条件は以下の如くであった。分析法の概略を以下に示す。

[標準物質]

被験物質の一部を標準物質として使用した。

[HPLC システム]

	機器名及び型式	メーカー
HPLC	2690 セパレーションモジュール	
検出器	2487 デュアル λ UV/VIS 検出器	Waters Corporation
データ処理装置	ミレニアム 32 クロマトグラフィーマネジャー	

[HPLC 測定条件]

カラム: Mightysil RP-18 GP (4.6 mm I.D. × 150 mm、粒子径 5 μm、

関東化学株式会社)

カラム恒温槽設定温度

: 40°C

移動相 : 精製水/アセトニトリル/リン酸二水素カリウム混液

(750/250/0.68, v/v/w)

流速 : 1.0 mL/min

検出 : UV (測定波長 245 nm)

注入量 : 10 μL

オートサンプラー内設定温度

: 室温(温度設定しない)

5.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりげっ歯類を用いた試験が必要とされており、また、 一般毒性試験、生殖発生毒性試験に広く用いられ、背景資料が豊富である系統を選択 した。

5.4 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crl:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター]の雌雄各 62 匹をそれぞれ 8 週齢で入手() し、入荷日を馴化 1 日と起算して、3 日間の検疫期間を含む 19 日間、馴化飼育した。その間、一般状態を毎日1回観察し、体重を馴化 1、3、8、15 及び 19 日に測定した。雌については、更に腟垢を馴化 4~17 日の間採取し、多数の角化上皮細胞から成る腟垢像を発情の指標として

4~5 日の周期で回帰するものを正常として性周期異常の有無を調べた。その結果、雌1例の頭部に外傷が認められた他、雌2匹に性周期異常が認められた。試験へは、頭部の外傷及び性周期異常の認められた雌3匹を除く雌雄より、順調な体重推移を示した各48匹をそれぞれ選択して10週齢で使用した。

注):試験計画書に従い、動物発注数は雌雄各60匹であったが、実際には各62匹が納入された。

5.5 群分け

前項に記載された馴化中の観察、検査結果に基づいて選抜された雌雄各 48 匹は、群分け当日の体重により層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群に割付けた。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組み合わせ(ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた)で行った。投与開始時の体重は、雄で 373~437 g(平均体重: 401 g)、雌は 209~265 g(平均体重: 239 g)であり、雌雄とも平均値±20%以内の体重範囲であった。群分けから除外された雄 14 匹及び性周期異常の雌 2 匹は投与開始後、試験から除外した。残りの雌 12 匹は交配用無処置動物として継続飼育したが、交配に用いなかったため、交配終了後、試験から除外した。

5.6 飼育条件

飼育は、温度 23±3°C (実測値:21~26°C)、相対湿度 50±20% (実測値:39~70%)、換気回数 10~15 回/h、照明 12 時間/日 (07:00~19:00)の動物飼育室 (飼育室番号:805号室)で行った。動物は、交配中を除いてブラケット式金属製網ケージ (W254×D350×H170 mm:リードエンジニアリング株式会社)へ個別に収容した。なお、妊娠 17 日から授乳 4 日までは、床敷(ホワイトフレーク: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エコンケージ(W340×D400×H185 mm:日本クレア株式会社)へ 1 腹ごと収容した。飼料は NMF 固形 (放射線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号:100415、100518、100611、100713)をステンレス製給餌器により自由に摂取させた。飲料水は水道水(御殿場市営水道水)自動給水装置又は給水瓶を用いて自由に摂取させた。飼料に関しては供試全ロットについて、床敷については、定期的(年6回)にそれぞれ Eurofins Scientific Analytice あるいは財団法人日本食品分析センターで実施された混入物質の分析結果を入手した。飲料水については、芝浦セムテック株式会社(旧社名:東芝機械環境センター株式会社)に定期的(年4回)に水質検査を依頼し、その結果を入手した。これらの検査結果より飼料、飲料水及び床敷中の混入物質が試験成績に影響を与える可能性のないことを確認した。

5.7 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に3桁の番号が連番で刻印された小動物用耳標をつけて行った。群分け後は、性別及び投与量ごと(対照群、低、中及び高用量の順)に4桁の番号をつけた。なお、1000の位は群、100の位は性(0番を雄、1番を雌)、10と1

の位は個体番号とした。飼育ケージには、投与量(群)ごとに色分けされ、試験番号、 投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、剖検予定日(雄)、交尾成立日(雌雄) 及び分娩日(雌)を明記したラベルを付した。

5.8 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421 に準じ、経口投与を選択した。投与期間は、雄では交配前 14 日間、交配期間 14 日間、その後剖検前日までの14 日間の計 42 日間、雌では交配前 14 日間、交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日までとした。なお、雌については 41~50 日間の投与期間となった。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 回/日(7 回/週)とした。

5.9 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与として一般的な強制経口投与とした。投与容量は 5 mL/kg 体重とし、1 日 1 回、08:49~12:02 の間にフレキシブル胃ゾンデを用いて投与液を投与した。ただし、投与時に分娩中であった動物は分娩終了を待って 14:44~16:02 の間に投与した。対照群には媒体(0.5 w/v%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液)のみを同様に投与した。個体ごとの投与液量は、最近時の体重を基に mL単位で小数第二位を四捨五入して算出した。

5.10 投与量及び群構成

投与量は 100、300 及び 1000 mg/kg/day の 3 用量とし、対照群を加え 4 群構成とした。1 群当たりの動物数は雌雄各 12 匹とした。群構成表を Text table 1.に示した。

Text	table	1	群構	成表

試験群	投与量 (mg/kg)	被験液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄雄	12 12	1001~1012 1101~1112
低用量群	100	20	5	雄雌	12 12	2001~2012 2101~2112
中用量群	300	60	5	雄雌	12 12	3001~3012 3101~3112
高用量群	1000	200	5	雄雌	12 12	4001~4012 4101~4112

5.11 投与量の設定根拠

本試験の投与量は、先に実施した「2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いた14日間反復経口投与毒性試験(投与量設定試験)」³⁾(投与量:100、300及び1000 mg/kg)の結果を参考に設定した。投与量設定試験において死亡例はみられず、一般状態の観察、体重、摂餌量、血液化学検査及び剖検所見に被験物質投与

による影響は認められなかったが、 $1000 \, \text{mg/kg}$ 投与群の雌で、血小板数に高値が認められ、100、 $300 \, \text{及び}$ $1000 \, \text{mg/kg}$ 投与群の雄で肝臓重量の高値が認められた。また、 $28 \, \text{日間反復投与毒性試験}^{\, 2)}$ (投与量: 100、 $300 \, \text{及び} \, 1000 \, \text{mg/kg}$) において、無影響量は雌雄ともいずれも $1000 \, \text{mg/kg}$ /day との報告がある。したがって、本試験における投与量は $1000 \, \text{mg/kg}$ を高用量とし、以下公比約 $3 \, \text{で除して} \, 300 \, \text{及び} \, 100 \, \text{mg/kg}$ をそれぞれ中及び低用量に設定した。

5.12 観察及び検査の方法

試験日の起算は、投与開始日を投与1日、投与1日から7日を投与1週、交尾成立日を妊娠0日、分娩終了日を授乳0日とし、以下に示す項目について、それぞれ記載の時期に観察及び検査を実施した。

5.12.1 一般状態の観察

全個体について、検疫・馴化期間中は毎日1回、投与期間中は毎日3回(投与前、投与直後及び投与約2時間後)、それぞれ体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態における異常の有無を観察した。なお、妊娠期間中の動物を手に持っての定期的な観察は、妊娠0、7、14及び20日に行った。

5.12.2 体重測定

全個体について、馴化 1、3、8、15 及び 19 日に体重を測定した。雄は投与 1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、42 日及び剖検日に、雌は投与 1、4、8、11、15 日 (未交尾動物は交配期間中の投与 18 及び 22 日)、妊娠 0、4、7、11、14、17 及び 20 日、授乳 0 及び 4 日並びに剖検日に体重を測定した。なお、午後に分娩の終了が確認された個体の授乳 0 日の体重を除いて、体重は午前中の投与前に測定した。

5.12.3 摂餌量測定

全個体について、雄は投与 1、4、8、11、15、32、36、40 ^{注)} 及び 42 日に、雌は投与 1、4、8、11 及び 15 日、妊娠 1、4、7、11、14、17 及び 20 日並びに授乳 2 及び 4 日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差を 1 日摂餌量として算出した。給餌量及び残餌量ともに午前中の投与前に測定した。

注):試験計画書では、投与39日を測定日としていたが、投与38日に誤って給餌量が測定されなかったため、改めて投与39日に給餌量を測定し、翌投与40日に残餌量を測定した。これによる測定日の変動は僅かであり、試験成績評価上、問題が生じるものではない。

5.12.4 腟垢検査

雌の全個体について、投与開始翌日から交尾が認められるまで毎日腟垢を採取し、 交配前投与期間中は 5.4 試験動物の項と同様に性周期異常の有無を調べるとともに発 情回数及び発情から次の発情までの日数(性周期)を求めた。交配期間中は腟垢内の

精子の有無を調べた。

5.12.5 交配方法

交配前投与期間終了後、同じ投与群の雌雄を 1:1 で終夜同居させ、翌朝、腟栓形成 あるいは腟垢中に精子を確認したものを交尾成立とみなした。交配開始日を 0 日と起 算して交尾までに要した日数を求めた。

5.12.6 分娩及び哺育観察

交尾の確認された雌動物は、妊娠 21 日から 1 日 2 回(午前、午後)分娩の有無並びにその終了を確認し、交尾成立日より分娩終了までの間を妊娠期間として 1 日単位で求めた。分娩が終了した母動物については、胎盤及び羊膜の処理等を指標として分娩異常の有無を観察した後、授乳 4 日まで出生児を哺育させた。授乳期間中は児集め、営巣及び授乳の状態等を指標として哺育異常の有無を観察し、授乳 5 日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査(5.12.8 項)に供した。

5.12.7 出生児の観察及び測定

母動物の分娩終了日を出生日(生後0日)とみなし、出生児数及び死産児数を数え、外表異常の有無を観察した。出生児は、性別を判定後、体重を測定した。授乳期間中は毎日1回、死亡児の有無を観察した。なお、死産児及び死亡児は廃棄した。

生後4日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ剖検を行い、体外表、胸部・腹部を含む器官・組織の異常の有無を肉眼的に調べた。なお、出生児の体重は個別に測定し、雌雄別に各腹の平均値を算出した。

5.12.8 病理学検査

5.12.8.1 剖検及び器官重量測定

最終投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させた後、体外表・ 頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行った。な お、授乳5日に剖検した母動物については黄体数及び着床痕数を数えた。更に、雌雄 の肝臓及び雄の精巣及び精巣上体については重量(絶対重量)を測定し、これらの器 官について剖検日の体重から体重100g当たりの相対重量を算出した。なお、精巣及 び精巣上体の重量については左右別々に測定し、その合計値で評価した。なお、授乳 2日に全ての出生児が死亡した母動物(動物番号:4109)についてはその時点で同様に検 査を実施した。

5.12.8.2 病理組織学検査

全ての個体の肝臓、雄の精巣、精巣上体、前立腺及び精嚢、雌の卵巣、子宮及び腟 並びに肉眼的異常部位を個体識別部(耳標を装着した耳介)とともにリン酸緩衝 10

vol%ホルマリン液で固定した(ただし、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後リン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液に置換した。)。個体識別部を除くこれらの器官は、パラフィン包埋した後、切片とし、ヘマトキシリン・エオジン(H・E)染色標本を作製した。鏡検は、対照群及び高用量群の全個体の肝臓及び上記内部生殖器並びに全ての肉眼的異常部位について行った。なお、精巣/卵巣、精巣上体及び精嚢は両側を、子宮は両角部を鏡検した。

5.13 統計解析

5.13.1 パラメータの算出

以下の式により交尾率、授精率、受胎率及び出産率を群ごとに、妊娠期間、着床率、 死産児率、外表異常率、出生率、生後4日生存率、生後0及び4日の性比を母動物ご とに算出した。なお、出生児の体重については母動物ごと雌雄別に平均値を求めた。

交尾率(%)=(交尾動物数/同居動物数)×100

授精率(%) = (雌を妊娠させた雄の数/交尾した雄の数)×100

受胎率(%) = (妊娠した雌の数/交尾した雌の数)×100

妊娠期間(日)=妊娠0日から分娩した日までの日数

出產率(%)=(出生児出産雌数/妊娠雌数)×100

着床率(%) = (着床痕数/黄体数) ×100

死産児率(%) = (死産児数/出生児数及び死産児数)×100

外表異常率(%) = (外表異常児数/出生児数)×100

出生率(%)=(出生児数/着床痕数)×100

生後 4 日生存率(%) = (生後 4 日生存児数/出生児数)×100

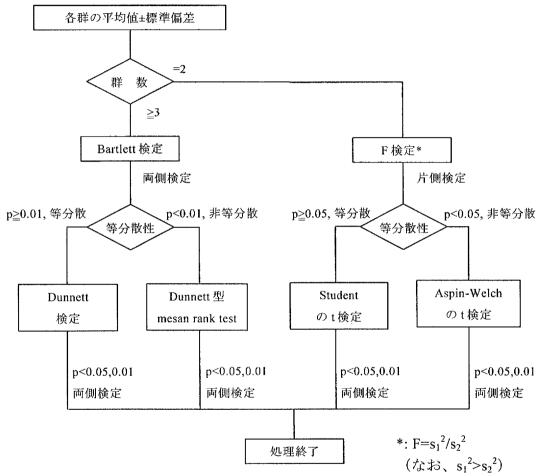
生後0日の性比=雄出生児数/出生児数

生後4日の性比=生後4日の雄生存児数/生後4日の生存児数

5.13.2 検定

データは対照群と各用量群との差について統計学的有意性の検定を行った。

体重、体重増加量(雄:投与 1~42 日、雌:投与 1~15 日、妊娠 0~20 日及び授乳 0~4 日、出生児:生後 0~4 日)、摂餌量、発情期像発現回数、性周期(発情周期)、交尾までに要した日数、妊娠期間、黄体数、着床痕数、生存児数、性比(生後 0 及び 4 日)及び器官重量(含、剖検時体重)は、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、次に示す模式図の方法に従って検定した。なお、交配期間中の雌の体重データ及び全児死亡母動物の器官重量データは統計解析より除外した。



着床率、死産児率、外表異常率、出生率及び生後 4 日生存率については、群ごとに 平均値及び標準偏差を求め、Dunnett型 mean rank test により平均順位の差の検定(有 意水準 0.05 及び 0.01、両側)を行った。

交尾率、授精率、受胎率、出産率は、各群の交尾動物数、雌を妊娠させた雄動物数、妊娠雌動物数、生存児出産雌動物数より算出し、Yeates の連続修正による χ^2 検定(有意水準 0.05 及び 0.01、両側)を行った。ただし、期待度数が 5 以下のセルがみられる場合には Fisher の直接確率計算法により検定(有意水準 0.05 及び 0.01、両側)を行った。

6. 試験結果

6.1 一般状態(Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)

いずれの投与群においても死亡動物はみられなかった。対照群の雌1例(動物番号: 1106)に皮下結節が妊娠 14 日以降みられたが、各用量群では投与期間を通じて、一般状態に異常は認められなかった。哺育状態に関し、1000 mg/kg 投与群の母動物1例(動物番号: 4109)に授乳不良が授乳1日にみられ、授乳2日までに同腹出生児の全てが死亡した。

6.2 体重(Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)

300 mg/kg 投与群の雌において、交配前投与期間中の体重増加量が対照群に比べ有意な低値を示した。しかし、1000 mg/kg では雌雄とも投与期間中を通して対照群と同様な体重推移を示し、300 mg/kg 投与群の雌における体重増加量の低値は用量との関連のない変化であることから偶発的な変動と考えられた。

6.3 摂餌量(Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)

300 mg/kg 投与群の雄において、投与 42 日の摂餌量が対照群と比べ有意な高値を示した。しかし、1000 mg/kg では雌雄とも対照群と同様な摂餌量を示し、300 mg/kg 投与群の雄における摂餌量の高値は用量との関連のない変化であることから偶発的な変動と考えられた。

6.4 器官重量(Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-8)

各用量群とも雌雄の肝臓並びに精巣及び精巣上体の絶対及び相対重量に対照群と比べ有意な差は認められなかった。

6.5 剖検所見(Table 5-1、5-2、Appendix 5-1~5-96)

雄では、精巣上体の結節が対照群及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例 (動物番号: 1006、4012) に、雌では、皮下結節及が対照群及び 100 mg/kg 投与群の各 1 例 (動物番号: 1106、2112)、乳腺の未発達が 1000 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号: 4109) にみられた。

6.6 病理組織学検査(Table 6-1、6-2、Appendix 5-1~5-96)

1000 mg/kg 投与群の雌 1 例(動物番号:4109)に乳汁分泌の減少がみられた他、対照群及び 1000 mg/kg 投与群の雄各 1 例(動物番号:1006、4012)の精巣上体の結節は精子肉芽腫、対照群及び 100 mg/kg 投与群の雌各 1 例(動物番号:1106、2112)の皮下結節は乳腺癌であった。その他、諸臓器に種々の変化がみられたが、その発現状況から偶発性変化と考えられた。

6.7 性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)

300 mg/kg 投与群において発情回数が対照群と比べ有意な増加を示し、100 及び300 mg/kg 投与群においての性周期が対照群に比べ有意な短縮を示した。しかし、1000 mg/kg 投与群の発情回数及び性周期には有意な差は認められず、各群の全例が14 日間の観察期間中に4~5 日周期で正常な発情回帰が認められていることから、100 及び300 mg/kg 投与群における変動は被験物質投与と関連しない偶発的なものと考えられた。

6.8 交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)

各群の雌雄全例において交尾が成立し、交尾した雌全例が妊娠し、交尾率、授精率及び受胎率とも100%であった。300 mg/kg 投与群において交尾までに要した日数が対照群と比べ有意な延長を示した。しかし、1000 mg/kg 投与群の交尾までに要した日数には有意な差は認められず、用量との関連のない変化であった。

6.9 分娩成績(Table 9、Appendix 8-1~8-4)

各群の妊娠動物全例が正常に分娩し、出産率、妊娠期間、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率には対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。100 mg/kg 投与群において黄体数が対照群に比べ有意な低値を示した。しかし、300 及び 1000 mg/kg 投与群の黄体数には有意な差は認められず、用量との関連のない変化であった。

6.10 出生児の性比及び外表観察(Table 10、Appendix 9-1~9-4)

出生児の生後 0 及び 4 日における性比には対照群と各用量群との間に有意な差は認められず、外表異常を有する出生児はいずれの群にもみられなかった。

6.11 出生児の生存率(Table 11、Appendix 10-1~10-4)

各群とも生後4日間までの生存性は良好であり、生後4日生存率に対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.12 出生児の体重(Table 12、Appendix 11-1~11-4)

各用量群の雌雄とも出生日及び生後 4日の体重及び体重増加量に対照群と比べ有意な差は認められなかった。

6.13 出生児の生後 4 日剖検所見(Table 13、Appendix 12-1~12-4)

各群とも出生児の体外表、胸部・腹部を含む器官・組織に肉眼的異常はみられなかった。

7. 考察

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸を 0 (対照群: 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液)、100、300 及び 1000 mg/kg/day の用量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 4 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に、性腺機能、交尾行動、受胎及び分娩などの生殖発生に及ぼす影響を検討した。

7.1 雌雄動物に対する影響

各群とも死亡動物はみられず、一般状態に異常は認められなかった。体重、摂餌量及び器官重量に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。分娩母動物において1000 mg/kg 投与群の1例に授乳不良がみられ、同腹出生児の全てが死亡した。本例については、剖検で乳腺の未発達、病理組織学検査では乳汁分泌の減少がみられた。しかし、本例を除く動物にはこれに関連する組織変化は認められず、後述の如く、生殖機能の側面においても同群に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められないことから、本例の組織並びに母体機能に認められた異常は個体特異的であり、偶発的変化と考えられた。

7.2 生殖発生に対する影響

雌の性周期及び雌雄動物の交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。これら交配成績に加え、雌雄内部生殖器に関する病理組織学検査では、被験物質投与に起因した変化は認められなかったことから、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の 1000 mg/kg/day投与は、精子形成及び排卵などの性腺機能、交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能に影響を及ぼさないと考えられた。

妊娠動物はいずれの群においても正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床 痕数、着床率、死産児率、出生児数、出生率に被験物質投与の影響を示唆する変化は 認められず、哺育状態に異常はみられなかった。したがって、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸 1000 mg/kg/day 投与は、妊娠維持、分娩及び哺育などの妊 娠母体の機能に対して影響を及ぼさないと判断した。

出生児に関し、出生日及び生後4日の体重及び性比並びに生後4日生存率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められず、出生児の外表及び剖検所見に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下における 2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の雌雄動物及に対する無影響量及び無毒性量はいずれも 1000 mg/kg/day と推察され、本被験物質の 1000 mg/kg 投与は交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能並び

に母体機能としての妊娠の維持、分娩及び哺育並びに出生児に対して影響を及ぼさないと考えられた。

8. 文献

- 1) HPLC による 2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の被験 液中濃度測定法バリデーション(媒体: 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液)(株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号: A-2268、2010年)
- 2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いる 28 日間の反復投与毒性試験, Toxicity Testing Reports of Environmental Chemicals, vol.1 pp.333-360, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京.
- 3) 2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験(投与量設定試験)(株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号: C-R142、2010年)

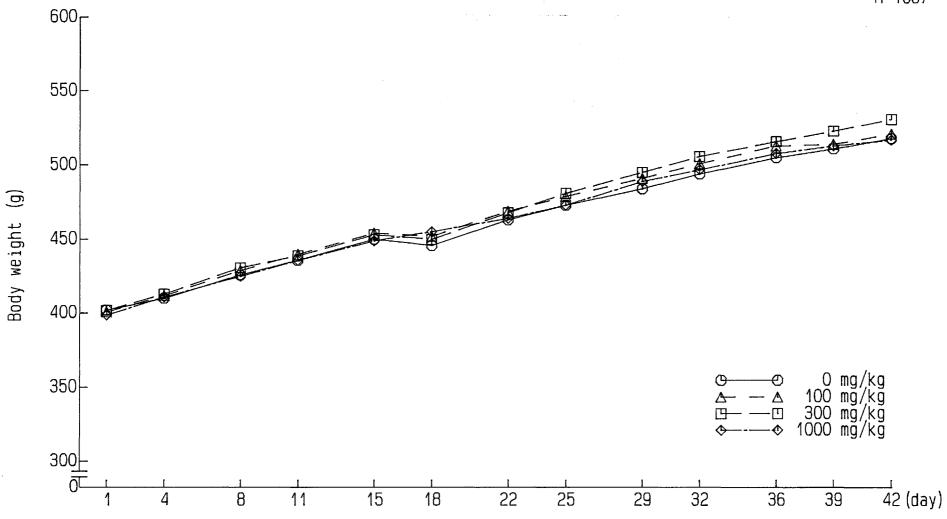


Fig.1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Body weight of male rats

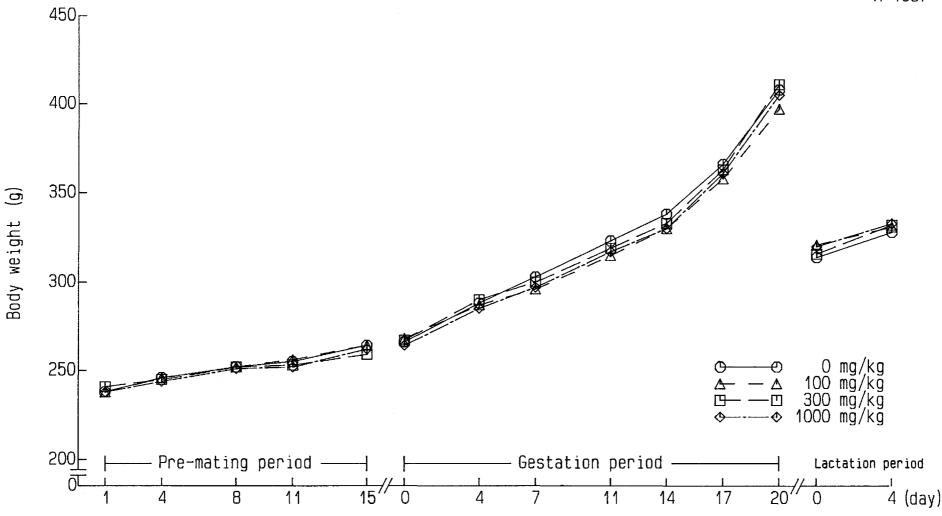


Fig.2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Body weight of female rats

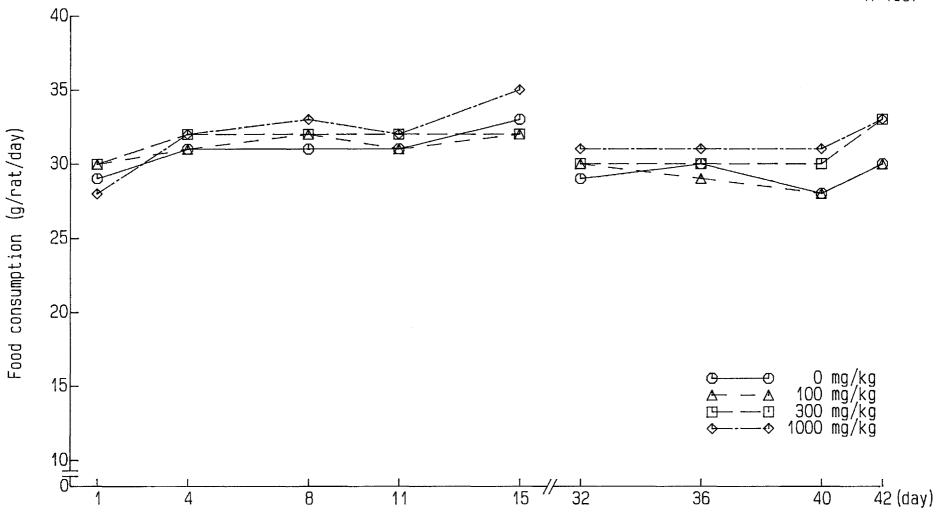


Fig.3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Food consumption of male rats

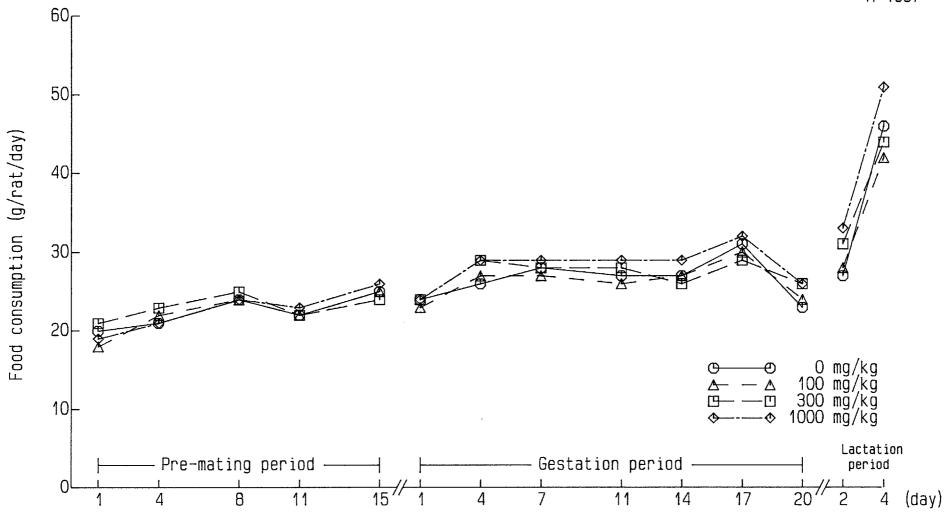


Fig.4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Food consumption of female rats

Table 1-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Clinical signs in male rats

	0.1			Day of	adminis	tration	ı	
Dose mg/kg	Signs	1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43a)
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
100	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
300	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
1000	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0

a): Day of necropsy

Table 1-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Clinical signs in female rats during the pre-mating period

~							Day	y of a	admin	istra	tion					
Dose mg/kg	Signs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	No. of animals No. of animals with abnormal findings	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0
100	No. of animals No. of animals with abnormal findings	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0
300	No. of animals No. of animals with abnormal findings	$^{12}_{0}$	12 0													
1000	No. of animals No. of animals with abnormal findings	12 0	12 0	12 0	12	12 0										

Table 1-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Clinical signs in dams during the gestation period

D	0.1											Adm	inis	trat	ion										
Dose mg/kg	Signs	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23a)
0	No. of dams No. of dams with abnormal findings Subcutaneous node, axillary region	12 0 0	0			12 0 0	12 1 1	5 0 0	0																
00	No. of dams No. of dams with abnormal findings	12 0		~-	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	4 0	0
00	No. of dams No. of dams with abnormal findings	12 0	12 0		12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	1	0
000	No. of dams No. of dams with abnormal findings	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	3 0	0

a): Gestation day

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Table 1-4 Clinical signs in dams during the lactation period

n	0.1		Admi	inistra	tion		
Dose mg/kg	Signs	0	1	2	3	4	- 5a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings Subcutaneous node, axillary region	1 1	1	1 1	1 1	1	1 1
100	No. of dams No. of dams with abnormal findings	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0
300	No. of dams No. of dams with abnormal findings	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0	12 0
1000	No. of dams No. of dams with abnormal findings Decrease in nursing behavior	12 0 0	12 1 1	12 ^{b)} 0 0	11 0 0	11 0 0	11 0 0

a): Lactation dayb): One dam was necropsied on day 2 of lactation because all pups died.

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Table 2-1 Body weight of male rats

			Pre-	nating p	eriod			Mating	period		P	ost-mati	ng perio	ã	
Dose mg/kg		1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	42a)	Gain 1-42
0	No. Mean S.D.	12 402 18	12 410 21	12 426 23	12 436 22	12 450 27	12 446 31	12 463 29	12 473 29	12 484 31	12 494 30	12 505 33	12 511 34	12 518 34	12 116 21
100	No. Mean S.D.	12 401 17	12 412 17	12. 429 16	12 440 17	12 454 21	12 452 18	12 469 19	12 479 20	12 491 25	12 501 25	12 513 28	12 514 30	12 521 31	$12 \\ 120 \\ 22$
300	No. Mean S.D.	12 402 18	12 413 17	12 431 20	12 439 20	12 453 20	12 450 21	12 468 25	12 481 26	12 495 27	12 506 30	12 516 32	12 523 32	12 531 32	12 129 21

Unit: g

No.

Mean

S.D.

No.: No. of animals
a): Day of administration
No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Body weight of female rats during the pre-mating period

Dana			Day of	administ	ration		Cain
Dose mg/kg		1	4	8	11	15	Gain 1-15
0	No. Mean	12 238	12 246	12 252	12 255	12 264	12 26
	S.D.	11	12	12	15	15	11
	No.	12	12	12	12	12	12 26
100	Mean S.D.	238 12	246 13	252 14	256 13	264 14	26 4
	No.	12	12	12	12	12	12
300	Mean S.D.	$\begin{array}{c} 241 \\ 12 \end{array}$	$\frac{245}{12}$	$\frac{252}{12}$	253 13	259 13	18* 6D
1000	No. Mean	$\begin{array}{c} 12 \\ 238 \end{array}$	12 244	$\begin{array}{c} 12 \\ 251 \end{array}$	$\begin{array}{c} 12 \\ 252 \end{array}$	$\begin{array}{c} 12 \\ 262 \end{array}$	$\begin{array}{c} 12 \\ 23 \end{array}$
	S.D.	15	14	17	14	15	23 8

Unit: g
No.: No. of animals
*: p<0.05 (Significant difference from control group)
D: Dunnett's test

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Table 2-3 Body weight of dams during the gestation period

Dogg				Adıı	inistrati	.on			Coin
Dose mg/kg		0	4	7	11	14	17	20a)	Gain 0-20
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	266	288	303	323	338	366	408	143
	S.D.	17	17	18	20	20	23	29	18
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	268	287	296	315	330	358	397	130
	S.D.	15	14	15	17	19	23	31	26
300	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	267	290	300	319	333	363	411	145
	S.D.	12	14	13	14	19	21	26	19
1000	No. Mean S.D.	12 264 16	12 285 14	12 297 15	12 317 17	12 330 19	12 361 23	12 405 30	$\begin{array}{c} 12\\141\\22\end{array}$

Unit: g

No.: No. of dams
a): Gestation day
No significant difference in any treated groups from control group

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Table 2-4

Body weight of dams during the lactation period

		Adminis	stration	O- 4-
Dose mg/kg		0	4a)	Gain 0-4
	No.	12	12	12
0	Mean S.D.	314 23	328 19	12 13 16
	No.	12	12	12
100	Mean S.D.	$\begin{array}{c} 321 \\ 20 \end{array}$	$\begin{array}{c} 331 \\ 21 \end{array}$	12 10 15
000	No.	12	12	12
300	Mean S.D.	316 14	$\begin{array}{c} 332 \\ 21 \end{array}$	16 14
1000	No.	12	11	11
1000	Mean S.D.	320 18	333 17	12 11

Unit: g
No.: No. of dams
a): Lactation day
No significant difference in any treated groups from control group

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Table 3-1

Food consumption of male rats

Dose			Pre-	mating pe	riod	Post-mating period				
mg/kg		1	4	8	11	15	32	36	40	42a)
0	No. Mean	12 29	12 31	12 31	12 31	12 33	12 29	12 30 3	12 28	12
v	S.D.	3	3	4	3	3	3	3	2	30 3
	No.	12 30	12	12	12 31	12	12	12 29	12 28	12
100	Mean S.D.	30 2	31 2	32 2	2	12 32 3	12 30 2	3	28	30 3
	No.	12 30	12 32	12	12 32	12 32	12 30	12 30	12 30	12
300	Mean S.D.	30 3	32 2	32 3	32 3	32 3	30 3	30 3	30 3	33* 3D
	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1000	Mean S.D.	28 3	32 3	33 4	32 3	12 35 5	12 31 2	31 2	31 3	33 3

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals
a): Day of administration
*: p<0.05 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Table 3-2 Food consumption of female rats during the pre-mating period

D			Day of	administr	ration	
Dose mg/kg		1	4	8	11	15
0	No. Mean	12 20	12 21	12 24	12 22	12 25
v	S.D.	3	2	2	3	4
	No.	12	12	12	12 22	12
100	Mean S.D.	18 2	22 2	24 3	22 2	12 25 2
	No.	12	12	12	12	12
300	Mean S.D.	12 21 1	23	12 25 3	12 22 4	24 4
1000	No. Mean	12 19	$\begin{array}{c} 12 \\ 21 \end{array}$	$\begin{array}{c} 12 \\ 24 \end{array}$	12 23	12 26 2
	S.D.	4	2	3	3	2

Unit: g/rat/day No.: No. of animals

No significant difference in any treated groups from control group

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Table 3-3

Food consumption of dams during the gestation period

Unit: g/rat/day
No.: No. of dams
a): Gestation day
No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Food consumption of dams during the lactation period

Daga		Administ	ration
Dose mg/kg		2	4a)
0	No.	12	12
	Mean	27	46
	S.D.	7	8
100	No.	12	12
	Mean	28	42
	S.D.	4	10
300	No.	12	12
	Mean	31	44
	S.D.	7	7
1000	No.	11 ^{b)}	11
	Mean	33	51
	S.D.	5	5

Unit: g/rat/day No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 2 because all pups were stillborn.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 4-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Organ weight of male rats

	Dose mg/kg		Body weight g	Liver g(g/100g BW)	Testes (R+L) g(g/100g BW)	Epididymides (R+L) mg(mg/100g BW)	
	0	No.	12	12	12	12	
	0	Mean S.D.	521 36	$18.37 \\ 2.25$	3.42 0.30	1310 97	
		No.	12	12	12	12	
Absolute	100	Mean S.D.	524 30	18.16 1.66	3.34 0.29	1236 81	
		No.	12	12	12	12	
	300	Mean S.D.	534 33	18.58 2.07	3.45 0.31	1287 91	
	1000	No. Mean	$\begin{array}{c} 12 \\ 524 \end{array}$	12 18.59	12 3.33	12 1276	
		S.D.	37	1.83	0.31	85	
		No.		12	12	12	
	0	Mean		3.52	0.66	252 18	
		S.D.		0.25	0.05		
Relative	100	No. Mean		$\begin{array}{c} 12 \\ 3.46 \end{array}$	12 0.64	12 236	
XCIACIVE	100	S.D.		0.22	0.06	16	
		No.		12	12	12	
	300	Mean S.D.		3.47 0.24	0.65 0.08	242 24	
		No.		12	12	12	
	1000	Mean S.D.		3.54 0.19	0.64 0.07	245 28	

No significant difference in any treated groups from control group

Table 4-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Organ weight of female rats

	_		Body	Liver
	Dose mg/kg		weight g	g(g/100g BW)
 	1116/116			5(6/2006 5)
		No	12	12
	0	No.	240	1E 20
	0	Mean	340	15.30
		S.D.	19	2.57
		No.	12	12
Absolute	100	Mean	339	14.73
	200	S.D.	339 22	1.59
		S.D.	22	
		No.	12	12
	300	Mean	347	16.25
		S.D.	17	1.41
		No.	11	11 16.11
	1000	Mean	343	16.11
		S.D.	15	1.93
		No.		12
	0	Mean		4.50
	U	Mean		0.71
		S.D.		0.71
		No.		12 4.34
Relative	100	Mean		4 34
RCIGULVC	100	S.D.		0.33
		3.0.		0.00
		No.		12
	300	Mean		4.69
	000	S.D.		0.34
		0.2.		0.01
		No.		11
	1000	Mean		4.69 0.52
		Mean S.D.		0.52

No significant difference in any treated groups from control group

Table 5-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzene sulfonic Acid

Gross pathological findings

Organs Findings	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 12	M 100 12	M 300 12	1000 12	
Epididymis Nodule		1	0	0	1	

M : Male

Table 5-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzene sulfonic Acid

Gross pathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg):	F	F 100	F 300	F 1000	
Findings	Number:	12	12	12	12	
Mammary gland Underdevelopment		0	0	0	1	
Skin+Subcutis Nodule		1	1	0	0	

F : Female

Table 6-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzene sulfonic Acid

Histopathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg):	M 0 12	100 12	300 12	1000 12	
Findings	Number:	12	14	12		
Epididymis						
Number examined		12	Ō	ō	12	
Not remarkable		5	, Ó	Ō	7	•
Cell infiltration	on,interstitial	6	O O	Ō	4	
minimal		6	0	ō	4	
Granuloma, sperma	atic	1	Ō	ō	1	
mild		1	0	0	1	
Liver			_	•		
Number examined		12	o o	Q	12	
Not remarkable		6	Ŏ	ŭ	8	
Microgranuloma		6	0	o o	4	
minimal		6	0	U	4	
Prostate		10	0	0	12	
Number examined		$\frac{12}{2}$	0	0	12	
Not remarkable			ŏ	Ů,	4	
Cell infiltration	on, initammatory	10	0	0	5	
mild		,	ŏ	0	1	
Seminal vesicle		J	U	U	1	
Number examined		12	0	0	19	
Not remarkable		12 12	ň	ŏ	$\begin{array}{c} 12 \\ 12 \end{array}$	
Testis		12	0	v	1.2	
Number examined		12	Ω	0	12	
Not remarkable		12 12	ŏ	ŏ	11	
Atrophy, seminife	erous tubular	-0	ŏ	ŏ	1	
minimal		ŏ	ŏ	ŏ	ī	

M : Male

Table 6-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzene sulfonic Acid

Histopathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0	F 100	F 300	F 1000		
Findings	Number:	12	12	12	12	•	
Liver							
Number examined	đ	12	0	0	12 10		
Not remarkable		5	0	0	10		
Hematopoiesis,	extramedullary	4	0	0	2		
minimal		4	Ō	Q.	2		
Microgranuloma		3	Ó.	Ō	Q		
minimal		2	<u>o</u>	<u>o</u>	0		
mild		1	0	Ü	Ü		
Ovary	3	10	2	0	10		
Number examined		12 12	0	0	$\begin{array}{c} 12 \\ 12 \end{array}$		
Not remarkable Uterus		12	U	U	1.4		
Number examined	4	12	0	0	19		
Not remarkable		$\begin{array}{c} 12 \\ 12 \end{array}$	Ŏ	ŏ	12 12		
Vagina	•	12	· ·	ŭ	± 2		
Number examined	i	12	0	0	12		
Not remarkable	-	12 12	Õ	0	12 12		
Mammary gland							
Number examined		1	1	0	1		
Decreased, lacta	ation	Õ	0	Ō	1		
mild		Õ	o o	0	1		
ADENOCARCINOMA		1	1	o o	Õ		
present		1	1	0	0		

F : Female

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Table 7 Estrous cycle in female rats during the pre-mating period

D	No of			Cou	int of es	trus		Mean duration
Dose mg/kg	No. of animals	0	1	2	3	4	Mean <u>+</u> S.D.	of cycles Mean <u>+</u> S.D.
0	12	0	0	0	10	2	3.2 <u>+</u> 0.4	4.4+0.4
100	12	0	0	0	6	6	3.5 <u>+</u> 0.5	4.0 <u>+</u> 0.1*DT
300	12	0	0	0	1	11	3.9 <u>+</u> 0.3**D	4.0 <u>+</u> 0.1*DT
1000	12	0	0	1	7	4	3.3 <u>+</u> 0.6	4.3 <u>+</u> 0.3

^{*:} p<0.05; **: p<0.01 (Significant difference from control group) D: Dunnett's test DT: Dunnett-type rank test

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Table 8

Mating and fertility of animals

			Male				Female	
Dose mg/kg	No. of males	Days until copulation Mean <u>+</u> S.D.	Copulation index (%) a)	Insemination index (%) b)	No. of females	Days until copulation Mean+S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) c)
0	12	2.2 <u>+</u> 1.3	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.2 <u>+</u> 1.3	12/12(100.0)	12/12(100.0)
100	12	3.2 <u>+</u> 2.3	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	3.2+2.3	12/12(100.0)	12/12(100.0)
300	12	3.3 <u>+</u> 0.7*DT	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	3.3 <u>+</u> 0.7*DT	12/12(100.0)	12/12(100.0)
1000	12	2.4 <u>+</u> 1.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.4+1.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)

a): (No. of copulated animals / No. of mated animals) \times 100 b): (No. of males which impregnated females / No. of copulated males) \times 100 c): (No. of pregnant females / No. of copulated females) \times 100

^{*:} p<0.05 (Significant difference from control group)

DT: Dunnett-type rank test

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with Table 9 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Delivery data on dams

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females with liveborns	Delivery index % a)	Gestation length in days	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implan- tation index % b)	No. of stillborns (%)c)	No. of liveborns	Live birth index % d)
0	Total Mean S.D.	12	12	100.0	22.2 0.6	197 16.4 1.4	190 15.8 1.4	96.5 3.9	1 (0.5) (1.8)	164 13.7 1.2	86.7 8.5
100	Total Mean S.D.	12	12	100.0	22.0 0.4	165 13.8* 3.5D	159 13.3 3.3	96.8 4.2	1 (1.0) (3.6)	145 12.1 3.7	91.2 14.7
300	Total Mean S.D.	12	12	100.0	21.8 0.4	195 16.3 2.1	189 15.8 2.0	97.0 5.0	2 (1.2) (2.9)	172 14.3 2.1	91.3 9.1
L000	Total Mean S.D.	12	12	100.0	21.8 0.6	181 15.1 3.2	175 14.6 3.6	95.6 8.6	0 (0.0) (0.0)	158 13.2 4.0	87.6 16.3

a): (No. of females which delivered liveborns / No. of pregnant females) × 100 b): (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) × 100 c): (No. of stillborns / No. of liveborns and stillborns) × 100 d): (No. of liveborns / No. of implantation sites) × 100 *: p<0.05 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 10 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Sex ratio and external examination of pups

			Live	borns	Sex ratio of	Da	ny 4	Sex ratio of	External c)
Dose mg/kg	No. of dams		No. of males	No. of females	liveborns at birth a)	No. of males	No. of females	live pups on day 4 b)	abnor- malities (%)d)
0	12	Total Mean S.D.	78 6.5 2.3	86 7.2 2.4	0.48 0.17	75 6.3 2.6	84 7.0 2.4	0.47 0.18	0 (0.0) (0.0)
100	12	Total Mean S.D.	72 6.0 1.9	73 6.1 2.4	0.51 0.10	71 5.9 1.8	73 6.1 2.4	0.50 0.10	0 (0.0) (0.0)
300	12	Total Mean S.D.	70 5.8 2.1	102 8.5 2.8	0.41 0.14	67 5.6 1.9	102 8.5 2.8	0.40 0.14	0 (0.0) (0.0)
1000	12	Total Mean S.D.	88 7.3 2.9	70 5.8 2.4	0.58 0.19	86 7.8 2.5	69 6.3 1.6	0.55 0.14	0 (0.0) (0.0)

a): No. of liveborn males / No. of liveborns

b): No. of live males on day 4 / No. of live pups on day 4 c): No. of liveborns with external abnormalities

d): (No. of liveborns with external abnormalities / No. of liveborns) X 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 11 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Viability index of pups

Dana		No.	No. of	live pups	Viability index on
Dose mg/kg		of dams	Day 0	Day 4	postnatal day 4 % a)
0	Total Mean S.D.	12	164 13.7 1.2	159 13.3 1.8	96.6 6.6
100	Total Mean S.D.	12	$145 \\ 12.1 \\ 3.7$	144 12.0 3.6	99.4 1.9
300	Total Mean S.D.	12	172 14.3 2.1	169 14.1 1.9	98.4 2.9
1000	Total Mean S.D.	12	158 13.2 4.0	155 12.9 4.5	91.1 28.8

a): (No. of live pups on day 4 / No. of liveborns on day 0) \times 100 No significant difference in any treated groups from control group

Table 12 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid Body weight of pups

D			Male			Female	
Dose mg/kg		0	4a)	Gain	0	4a)	Gain
0	No. Mean S.D.	12 6.6 0.6	12 10.0 0.8	$\begin{array}{c} 12 \\ 3.4 \\ 0.4 \end{array}$	12 6.3 0.5	12 9.6 0.7	12 3.3 0.5
100	No. Mean S.D.	12 6.7 0.5	12 10.4 1.1	12 3.8 0.9	12 6.3 0.4	12 10.1 1.3	$12 \\ 3.7 \\ 1.1$
300	No. Mean S.D.	12 6.7 0.4	12 9.8 1.0	12 3.2 0.7	12 6.3 0.3	9.3 0.9	12 3.0 0.7
1000	No. Mean S.D.	12 6.7 0.4	11 ^{b)} 10.2 1.0	11 3.4 0.8	11 ^{c)} 6.3 0.4	11 9.6 1.1	11 3.3 0.8

Unit: g

Unit: g
No.: No. of dams
a): Postnatal day
b): All pups in one dam died.
c): Female pups were not born in one dam.
No significant difference in any treated groups from control group

Table 13 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzen sulfonic Acid

Gross pathological findings in pups on postnatal day 4

	Dose (mg/kg)	0	100	300	1000	
Male No. of pups examined		75	71	67	86	
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0	
Female No. of pups examined		84	73	102	69	
No. of pups with abnormal findings	,	0	0	0	0	