

試験報告書

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸のラットを用いた
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：0765

日本バイオアッセイ研究センター

目 次

	頁
本文	
I 要約	2
II 材料・方法	3
1. 被験物質及び媒体	3
1.1 被験物質の名称等	3
1.2 被験物質の構造式、分子式及び分子量	3
1.3 被験物質の物理化学的性状等	3
1.4 使用被験物質	3
1.5 被験物質の同一性	4
1.6 被験物質の安定性	4
1.7 媒体	4
2. 動物	4
2.1 試験動物	4
2.2 群の構成と動物数	5
2.3 群分け方法	5
2.4 動物の個体識別	5
2.5 使用飼育室及び他試験・異種動物との区別	5
2.6 飼育条件	6
1) 飼育環境	6
2) 飼料	6
3) 飲水	6
3. 投与	7
3.1 投与方法	7
3.2 投与用量及び投与液量	7
3.3 投与用量の設定理由	7
3.4 被験物質投与液の調製及び保管方法	8
3.5 被験物質調製液中の被験物質の濃度及び均一性	8
3.6 被験物質調製液中の被験物質の安定性	8
3.7 投与期間	8
4. 反復投与毒性に関する観察・検査	9
4.1 一般状態の観察	9
4.2 行動機能観察	9
1) 詳細観察	9
2) 反応性検査	9
3) 握力測定	9
4) 自発運動量測定	9
5) 行動機能観察の頻度	9
4.3 体重測定	10

4.4 摂餌量測定	10
4.5 尿検査	10
4.6 解剖	10
4.7 血液学検査	11
4.8 血液生化学検査	11
4.9 血中ホルモン検査	11
4.10 病理学検査	11
1) 剖検	11
2) 臓器重量測定	11
3) 臓器の採取・保存	12
4) 病理組織学検査	12
5. 生殖発生毒性に関する観察・検査	12
5.1 性周期の観察	12
5.2 交配	13
5.3 分娩及び哺育	13
5.4 妊娠黄体数及び着床痕数	13
5.5 児動物の観察・検査	13
1) 出生時の産児数、性及び外表観察	13
2) 生存児数及び一般状態の観察	14
3) 体重測定	14
4) 剖検	14
6. 数値処理と統計方法	14
6.1 数値の取扱いと表示	14
6.2 統計方法	15
7. 試験の信頼性	15
III 試験成績	16
III-1 反復投与毒性	16
1. 一般状態	16
1.1 雄	16
1.2 雌	16
2. 行動機能	16
2.1 詳細観察所見	16
1) 雄	16
2) 雌	17
2.2 反応性	17
1) 雄	17
2) 雌	17
2.3 握力	17
1) 雄	17
2) 雌	17
2.4 自発運動量	17
1) 雄	17
2) 雌	17

3. 体重	18
3.1 雄	18
3.2 雌	18
4. 摂餌量	18
4.1 雄	18
4.2 雌	18
5. 尿検査	19
5.1 雄	19
5.2 雌	19
6. 血液学検査	19
6.1 雄	19
6.2 雌	19
7. 血液生化学検査	19
7.1 雄	19
7.2 雌	20
8. 血中ホルモン検査	20
8.1 雄	20
8.2 雌	20
9. 病理学検査	20
9.1 剖検（肉眼観察）	20
1) 雄	20
2) 雌	20
9.2 臓器重量	21
1) 雄	21
2) 雌	21
9.3 病理組織学検査	21
1) 雄	21
2) 雌	22
III-2 生殖発生毒性	22
1. 性周期	22
2. 交配成績	22
3. 妊娠及び分娩	22
4. 着床	23
5. 児動物と哺育	23
5.1 出生日（哺育0日）の児動物	23
5.2 哺育状況と児動物の一般状態	23
5.3 哺育4日の児動物	23
5.4 剖検（肉眼観察）	23
IV 考察	24
V 文献	26

TABLES

Table 1	General clinical observations of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	28
Table 2	Detailed clinical observations (functional observational battery) of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	29
Table 3	Reflex/reactions (functional observational battery) of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	30
Table 4	Grip strength (functional observational battery) of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	31
Table 5	Locomotor activity (functional observational battery) of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	32
Table 6	Body weight changes of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	33
Table 7	Body weight changes of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	34
Table 8	Body weight changes of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	35
Table 9	Food consumption changes of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	36
Table 10	Food consumption changes of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	37

Table 11	Food consumption changes of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	38
Table 12	Urinalysis of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	39
Table 13	Hematology of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	40
Table 14	Hematology of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	41
Table 15	Hematology of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	42
Table 16	Biochemistry of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	43
Table 17	Biochemistry of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	44
Table 18	Biochemistry of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	45
Table 19	Hormone analysis of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	46
Table 20	Gross findings of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	47
Table 21	Organ weights of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	48

Table 22	Organ weights of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	49
Table 23	Organ weights of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	50
Table 24	Histopathological findings of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	51
Table 25	Histopathological findings of female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	52
Table 26	Estrous cycle and reproductive performance of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	53
Table 27	Summary of implantation and development of pups from dams treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	54
Table 28	External abnormalities, general clinical observations and gross findings in necropsy of pups from dams treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	55

FIGURES

Figure 1	Body weight changes of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	57
Figure 2	Body weight changes of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	58
Figure 3	Body weight changes of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test	58

- Figure 4 Food consumption changes of male rats treated orally with
2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and
reproductive/developmental toxicity screening test 59
- Figure 5 Food consumption changes of female rats (dams) treated orally with
2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and
reproductive/developmental toxicity screening test 60
- Figure 6 Food consumption changes of satellite female rats treated orally with
2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and
reproductive/developmental toxicity screening test 60

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸のラットを用いた
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：0765

本文

I 要約

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の反復投与毒性及び生殖発生毒性を検討するために、OECD テストガイドライン 422 に基づき、試験を実施した。

本試験では、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸を、0（媒体対照、注射用水）、20、100 及び 500 mg/kg の用量で、CrI:CD(SD)ラットの雌雄（12 匹／群、10 週齢）に、雄では 42 日間、雌では哺育 4 日までの 41～46 日間、毎日、強制経口投与し、雌雄動物に対する反復投与の影響、ならびに親動物の生殖及び哺育 4 日までの児動物の発生・発育に及ぼす影響を検討した。また、対照群と 500 mg/kg 投与群については、雄では交配に供した 12 匹のうち 5 匹を回復動物とし、雌では交配に供した動物とは別にサテライト雌 10 匹を用意して、そのうちの 5 匹を回復動物とし、42 日間の反復投与終了後、2 週間の回復期間を設けた。

投与期間の一般状態観察で、500 mg/kg 群の雌雄に呼吸の異常（異常呼吸音、不整呼吸、開口呼吸等）が認められた。500 mg/kg 群の雄 1 例では、回復期間途中から呼吸が深大になった。雌の 500 mg/kg 群には、投与期間に外部生殖器周囲の尿による汚染も観察された。体重増加の抑制が雄の 500 mg/kg 群でみられたが、雌の体重に投与の影響は認められなかった。500 mg/kg 群のサテライト雌 1 例が、投与期間途中で突然死亡した。本例の死因は気管上部の炎症に起因した気道閉塞による窒息死と推定され、また、気管上部の炎症は他の動物にはみられないことから、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の毒性による死亡ではないと判断した。

血液学検査の結果、雄の 500 mg/kg 群で MCH が減少した。血液生化学検査の結果、500 mg/kg 群には、雄では総蛋白とアルブミンが減少、妊娠・出産雌では BUN、クレアチニン及び無機リンが減少、サテライト雌では総蛋白が減少し、AST が上昇した。また、尿検査では 500 mg/kg 群のサテライト雌 1 例にグルコースが検出された。ただし、これらの所見の全てに回復性が認められた。

雄と妊娠・出産雌の臓器重量に投与の影響は認められなかった。500 mg/kg 群のサテライト雌では、回復期間終了時に肝臓及び腎臓の実重量と重量体重比が増加した。病理組織学検査の結果、雌雄ともに投与の影響を示唆する病変は認められなかった。

性周期、交配、妊娠、分娩及び児動物の発生・発育に投与の影響は認められなかった。

本試験における 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の反復経口投与により、500 mg/kg 群の雌雄には呼吸の異常等がみられたが、100 mg/kg 群には影響がみられなかったことから、反復投与毒性に関する無毒性量（NOAEL: No Observed Adverse Effect Level）は雌雄ともに 100 mg/kg/day と結論される。また、500 mg/kg 群で雌雄親動物の生殖能力や児動物の発生・発育に投与の影響がみられなかったことから、生殖発生毒性に関する無毒性量は 500 mg/kg/day であると結論される。

II 材料・方法

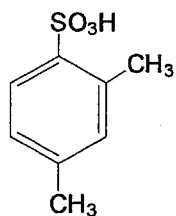
1. 被験物質及び媒体

1.1 被験物質の名称等

名 称 : 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸
 2,4-Dimethylbenzenesulfonic acid
 別 名 : Benzenesulfonic acid, 2,4-dimethyl-
 m-Xylene-4-sulfonic acid
 C A S N o . : 88-61-9
 官報公示整理番号 : (9)-317

1.2 被験物質の構造式、分子式及び分子量

構 造 式 :



分 子 式 : $C_8H_{10}O_3S$

分 子 量 : 186.23

1.3 被験物質の物理化学的性状等²⁾

性 状 : 無色から白色の結晶または結晶性粉末

溶 解 性 : 水に易溶

保管条件 : 室温かつ遮光

1.4 使用被験物質³⁾

名 称 : m-キシレン-4-スルホン酸 n 水和物

製 造 元 :

ロット番号 :

純 度 : 99.7% (無水物として)

水 分 : 16.1%

1.5 被験物質の同一性 (Appendix A 1)

被験物質の同一性は、使用する被験物質の赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) を用いて測定し、文献値⁴⁾と比較することで確認した。

その結果、被験物質の赤外吸収スペクトルが文献値と同じ波数にピークを示したことから、被験物質は 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸であると判断した。

1.6 被験物質の安定性 (Appendix A 2)

被験物質の安定性は、高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 1090) を用いて、使用開始前と使用終了後に測定したクロマトグラムを比較することで確認した。

その結果、使用開始前と使用終了後のクロマトグラムに差がみられなかったことから、被験物質はこの期間において安定していたと判断した。

1.7 媒体

名 称： 注射用水 (日本薬局方)
製 造 元： (株)大塚製薬工場
ロット番号： 0E82N
保管条件： 室温かつ遮光

2. 動物

2.1 試験動物

動物は日本チャールス・リバー(株) (神奈川県横浜市港北区新横浜 3-17-6) 厚木飼育センター生産の CrI:CD(SD)ラット (SPF) の雌雄を使用した。

この動物を選択した理由は、反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験で一般的に使用され、背景データが豊富な動物種及び系統であることによる。

雄 58 匹と雌 82 匹を 8 週齢で導入し、導入日を含む 7 日間を検疫と馴化を兼ねて飼育した後、さらに、8 日間の予備飼育期間を設けた。これらの飼育期間中、一般状態を毎日観察し、導入日と検疫・馴化終了日には体重を測定した。予備飼育期間には、行動機能に関する詳細観察を 1 回行い、雌については性周期を毎日観察した。これらの結果に異常がみられなかった動物のうち、投与開始日に測定した体重の中央値に近い雄 48 匹と雌 68 匹を試験動物として選定した (投与開始時体重範囲、雄：355～428g、雌：220～249g)。投与開始時週齢は雌雄ともに 10 週齢であった。

2.2 群の構成と動物数

群の構成は対照群 1 群と被験物質投与群 3 群を基本として、1 群当り雌雄各 12 匹の動物数とした。被験物質投与による影響の回復性の有無を検討するために、雌では対照群と 500 mg/kg 群に交配をさせない各群 10 匹のサテライト動物を追加した。対照群と 500 mg/kg 群の雄各 5 匹及び同群の雌サテライト動物各 5 匹については、投与期間終了後 14 日間の回復期間を設けた（回復動物）。

群 名 称	動物数（動物番号）	
	雄	雌
対 照 群	12 匹（1001～1012） ¹⁾	12 匹（2001～2012）
20 mg/kg 群	12 匹（1101～1112）	12 匹（2101～2112）
100 mg/kg 群	12 匹（1201～1212）	12 匹（2201～2212）
500 mg/kg 群	12 匹（1301～1312） ¹⁾	12 匹（2301～2312）
雌サテライト動物		
対 照（サテライト）群	—	10 匹（2401～2410） ¹⁾
500 mg/kg（サテライト）群	—	10 匹（2501～2510） ¹⁾

¹⁾ 動物番号の大きい 5 匹を回復動物とした。

2.3 群分け方法

群分けは、被験物質投与開始直前に、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）⁵⁾で行った。初めに雄 48 匹と雌 68 匹の試験動物（「2.1 試験動物」の項）をそれぞれ体重値の大きい動物から順に各群に 1 匹ずつ無作為に割り当て、二巡目以降は各群の動物の合計体重を比較し、値の小さい群から順に体重値の大きい動物を割り当てた。

2.4 動物の個体識別

動物の個体識別は、尾に油性マーカーで色素塗布する方法で行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。児動物の個体識別は行わなかった。

2.5 使用飼育室及び他試験・異種動物との区別

動物はバリア区域内の独立した飼育室（雄 313 室・雌 314 室）に収容した。交配中は雄の飼育室に雌を移動させた。他試験・異種動物との区別は、飼育室入口の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示して行った。

2.6 飼育条件

1) 飼育環境

飼育室の環境条件及び使用したケージ等を以下に示した。飼育室の温度と湿度は実測値の範囲を< >内に示した。

温度：23±2℃ <313 室；21.9－24.1℃、314 室；22.5－23.8℃>

湿度：55±15% <313 室；52－67%、314 室；52－78%>

明暗サイクル：12 時間点灯(8:00～20:00)/12 時間消灯(20:00～8:00)

換気回数：15～17 回/時

ケージへの動物の収容方法：

交配中；交尾が確認されるまで雌雄 1 匹ずつを同居（313 室）

分娩・哺育中；母動物と児動物を同居

その他の飼育期間；単飼

ケージの材質・形状・寸法等：

交配中；ステンレス製群飼網ケージ（340(W)×294(D)×176(H) mm）

妊娠 18 日以降；ステンレス製分娩用ケージ（340(W)×294(D)×176(H) mm）

ケージ床に床敷を入れた。

その他の飼育期間；ステンレス製 2 連網ケージ（170(W)×294(D)×176(H) mm/匹）

床敷：ALPHA-dri™ (Shepherd Specialty Papers, Inc.)

試験に使用した床敷の分析は、NP Analytical Laboratories のデータを入手し、製造元が規定する保証値と照合して異常のないことを確認し、そのデータは保管した。

飼育器材の滅菌方法：

飼育器材（ラック・ケージ・餌箱・給水ノズル・作業台車・トレイ・床敷等）は、オートクレーブを用いて滅菌（約 120℃、15 分以上）した。

2) 飼料

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)（東京都板橋区小豆沢 3-6-10）千葉工場製造の CRF-1 固型（30KGy-γ線照射滅菌飼料、Lot No.100706）を飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、解剖前日の夕方からは絶食させた。

使用した飼料の栄養成分と夾雑物の分析データは、オリエンタル酵母工業(株)から入手し保管した。夾雑物の分析結果については、試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した。

3) 飲水

飲水は市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

飲水の水質は、試験施設として定期的に実施している水質検査の結果を、水道法を参考に

して試験計画書で規定した項目及び許容基準と照合して、異常のないことを確認した。水質検査は、(財)食品薬品安全センター秦野研究所（神奈川県秦野市落合 729-5）に依頼し、その結果は保管した。

3. 投与

3.1 投与方法

1日1回、午前中に、胃ゾンデとシリンジを用いて強制経口投与した。ただし、投与前の分娩・哺育観察等で要した時間により、投与時刻が正午を過ぎた動物もいた。

3.2 投与用量及び投与液量

投与用量は体重 1 kg 当り 20 mg、100 mg 及び 500 mg の 3 段階に設定した。対照群には媒体（注射用水）のみを投与した。

投与液量は体重 1 kg 当り 5 mL とし、投与直前に測定した体重をもとに個体別に算出した。

3.3 投与用量の設定理由

本試験の投与用量を設定するために、14 日間反復経口投与毒性予備試験（以下、予備試験）を実施した。予備試験の投与用量は、1000 mg/kg を最高用量とし、以下、600 mg/kg、300 mg/kg、100 mg/kg に設定した。10 週齢の Crl:CD(SD) ラット、1 群当り雌雄各 5 匹に、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸を 14 日間、毎日、強制経口投与し、投与終了翌日に剖検した。

その結果、1000 mg/kg 群の雄 1 例と 600 mg/kg 群の雌 1 例が、呼吸困難を伴う瀕死状態になったため切迫屠殺した。この 2 例には肺の収縮不全の他に異常は認められなかった。投与初期に 1000 mg/kg 群の多くの雌雄に不整呼吸がみられた。また、異常呼吸音が聴取される動物もあった。

1000 mg/kg 群と 600 mg/kg 群では雌雄ともに投与 1 週の体重及び摂餌量が減少したが、投与 2 週には回復傾向がみられた。剖検の結果、1000 mg/kg 群と 600 mg/kg 群の雌雄数例に胃壁の肥厚が観察された。

300 mg/kg 群と 100 mg/kg 群では、雌雄ともに投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験の高用量には、投与の影響が認められなかった 300 mg/kg より高く、瀕死例のみられた 600 mg/kg に近い用量を設定することが望ましいと判断し、高用量に 500 mg/kg を設定、以下、中用量には 100 mg/kg、低用量には 20 mg/kg を設定した。

3.4 被験物質投与液の調製及び保管方法

秤量した被験物質に注射用水（媒体）を加えて攪拌し、100 mg/mL、20 mg/mL 及び 4 mg/mL の濃度（wt/vol）になるように調製した。ただし、使用被験物質には 16.1%の水分が含まれているため、無水物に換算した重量を秤量して調製した。被験物質は注射用水に溶解した。投与液の調製は、調製液中の被験物質の安定性が確認された期間（8 日間）を超過しない頻度で行った。調製した投与液は投与日まで室温かつ遮光の条件下で保管し、8 日以内に使用した。

3.5 被験物質調製液中の被験物質の濃度及び均一性 (Appendix A 3, A 4)

被験物質調製液中の被験物質の濃度と均一性は、初回調製時の調製液を濃度毎に 7 点サンプリングして、それぞれの被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ（Agilent Technologies 1090）を用いて測定することで確認した。

その結果、各濃度の調製液における 7 点の平均濃度は各設定濃度に対して 96.0～98.5% の範囲にあり、7 点における濃度のばらつきは変動係数 0.35～0.70% の範囲にあった。

3.6 被験物質調製液中の被験物質の安定性 (Appendix A 5)

被験物質調製液中の被験物質の安定性を確認するために、投与開始前に高用量（100 mg/mL）及び低用量（4 mg/mL）の被験物質調製液を作製し、室温・遮光の条件下で 8 日間密閉・保管した。被験物質調製時と 8 日目の被験物質調製液をそれぞれ 7 点サンプリングし、被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ（Agilent Technologies 1090）を用いて測定してそれぞれの結果を比較した。

その結果、被験物質の平均濃度は、調製時の濃度を 100%とした場合に、保管 8 日目では高用量は 105%、低用量は 103%であった。従って、8 日間の室温かつ遮光の条件下では被験物質調製液中の被験物質は安定であると判断した。

3.7 投与期間

雄：交配前 14 日間、交配期間 14 日間及び交配期間終了後 14 日間の計 42 日間、毎日投与した。

雌：交配前 14 日間、交配期間中（交尾成立まで、最長 5 日間）、そして交尾・分娩した雌には妊娠期間及び哺育 4 日までの計 42～46 日間、交尾したが分娩しなかった雌には妊娠 25 日相当日までの 41～43 日間、毎日投与した。ただし、分娩中及び投与前に分娩した動物には、その日の投与はしなかった。また、雌サテライト動物には 42 日間、毎日投与した。

対照群と 500 mg/kg 群の雄及び雌サテライト動物各 5 匹には、投与期間終了後に 14 日間

の回復期間を設けた。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査

4.1 一般状態の観察

一般状態の観察は、投与期間中には毎日 2 回（投与前及び投与後）行い、回復期間中には毎日 1 回（午前中）行った。

4.2 行動機能観察（FOB：Functional Observational Battery）

1) 詳細観察

行動機能に関する詳細観察は、ケージから動物を取り出す際、ケージから動物を取り出した後及び作業台上で実施した。ケージから動物を取り出す際には接触反応や取り出し易さを観察した。ケージから動物を取り出した後には、扱い易さ・体温・被毛状態・皮膚の色・眼の状態及び流涎・排尿・排糞の有無を観察した。作業台上では、姿勢・活動性・警戒/探索行動・歩行状態・常同行動・呼吸及び振戦・攣縮・痙攣の有無を観察した。

2) 反応性検査

反応性検査は、視覚・聴覚・痛覚・瞳孔反射・空中正向反射について行った。

3) 握力測定

握力測定装置（MK-380CM, 室町機械(株)）を用いて、前肢・後肢ともに 2 回ずつ握力を測定し、それぞれの平均値をその個体の値とした。

4) 自発運動量測定

自発運動量測定装置（SCANET MV-10, (有)メルクエスト）を用いて、各動物 60 分間の自発運動量を測定した。

5) 行動機能観察の頻度

雄：詳細観察は投与期間及び回復期間に週 1 回行った。反応性検査、握力測定及び自発運動量測定は投与 6 週に 1 回行った。

雌：詳細観察は投与期間及び回復期間に週 1 回行った。ただし、投与 6 週の観察は分娩や哺育時の動物へのストレス軽減のためにサテライト動物のみ行った。反応性検査、握力測定及び自発運動量測定は、分娩した動物については、分娩日の近い動物から各群 5 匹を選定して解剖前日（分娩 4 日後）に行い、サテライト動物については投与 6 週に 1 回行った。

4.3 体重測定

雄：投与期間は投与 1（投与開始日）・8・15・22・29・36・42 日に体重を測定した。
また、回復期間は回復 1・8・14 日に体重を測定した。

交配用雌：交配前は投与 1・8・15 日に体重を測定した。交尾した雌は妊娠 0・7・14・20 日に測定し、分娩した雌は分娩日と分娩 4 日後（哺育 0 日と哺育 4 日）にも測定した。

雌サテライト動物：投与期間は投与 1・8・15・22・29・36・42 日に体重を測定した。
また、回復期間は回復 1・8・14 日に体重を測定した。

解剖日には絶食後の体重（搬出時体重）を測定した。死亡動物は死亡日に搬出時の体重を測定した。

4.4 摂餌量測定

雄：投与期間は投与 1～8・8～15・29～36・36～42 日の摂餌量を測定した。また、回復期間は回復 1～8・8～14 日の摂餌量を測定した。

交配用雌：交配前は投与 1～8・8～15 日の摂餌量を測定した。交尾した雌は妊娠 0～7・7～14・14～20 日、分娩した雌は哺育 0～4 日の摂餌量を測定した。

雌サテライト動物：投与期間は投与 1～8・8～15・29～36・36～42 日の摂餌量を測定した。また、回復期間は回復 1～8・8～14 日の摂餌量を測定した。

4.5 尿検査

雄と雌サテライト動物は、投与 6 週に 1 回、投与前の新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティスティックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）を用いて下記の項目について検査した。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

グルコースが陽性を示した 500 mg/kg 群のサテライト雌 1 例については、回復期間終了時にもグルコースの有無を検査した。

4.6 解剖

雄は最終投与日（投与 42 日）の翌日に回復動物を除いて解剖した（投与期間終了時解剖）。
回復動物は回復期間（投与終了後 2 週間）終了日の翌日に解剖した（回復期間終了時解剖）。

交配用雌は以下の日に解剖した。

分娩した雌：分娩 5 日後

交尾したが分娩しなかった雌：妊娠 26 日相当日

雌サテライト動物は最終投与日の翌日回復動物を除いて解剖した（投与期間終了時解剖）。

回復動物は回復期間終了日の翌日に解剖した（回復期間終了時解剖）。

以上の解剖動物はエーテル麻酔下で腹大動脈より採血した後、放血・致死させた。

死亡した動物は死亡発見後に速やかに解剖した。

4.7 血液学検査 (Appendix B)

解剖時に生存していた動物をエーテル麻酔下で腹大動脈より採血し、下記の項目を検査した。EDTA-2 カリウム入り採血管に採取した血液は全血を用い、クエン酸ナトリウム入り採血管（*印検査項目）に採取した血液は遠心分離して得られた血漿を用いて検査した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、白血球数、白血球分類、血小板数、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）*、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、網赤血球比

4.8 血液生化学検査 (Appendix B)

解剖時に生存していた動物をエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血し、遠心分離して得られた血漿を用いて下記の項目を検査した。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、尿素窒素（BUN）、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン AST、ALT、ALP、 γ -GTP、LDH、総ビリルビン、CK

4.9 血中ホルモン検査 (Appendix B)

解剖時に生存していた動物をエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血し、遠心分離して得られた血漿を用いて、トリヨードサイロニン（T3）、サイロキシン（T4）及び甲状腺刺激ホルモン（TSH）濃度を測定した。

4.10 病理学検査

1) 剖検

全動物について肉眼的な病変の有無を観察した。

2) 臓器重量測定

解剖時に生存していた動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。下垂体、甲状腺、前立腺（腹葉）及び精囊・凝固腺の湿重量は、10%中性リン酸緩衝

ホルマリン溶液で1晩の固定後に測定した。また、臓器実重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：下垂体、甲状腺、心臓、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、精巣または卵巣、精巣上体または子宮、前立腺（腹葉）、精囊・凝固腺、脳、肺

3) 臓器の採取・保存

下記に示した臓器・組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定・保存した。ただし、精巣と精巣上体はブアン固定液で固定後、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で保存した。

保存臓器・組織：脳、下垂体、脊髄、眼球、ハーダー腺、甲状腺、上皮小体、心臓、舌、唾液腺、食道、鼻腔（腔に固定液を注入した）、鼻咽頭、喉頭、気管、肺（左肺に固定液を注入した）、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、脾臓、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、精巣、精巣上体、精囊・凝固腺、前立腺、卵巣、子宮、膣、膀胱、リンパ節（腋窩・鼠径等）、末梢神経（坐骨神経）、骨髓（大腿骨）、骨（大腿骨）、皮膚、乳腺、筋肉

4) 病理組織学検査

全動物について、下記に示した臓器・組織の病理組織学検査を行った。検査は、固定後の臓器・組織をパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色した組織標本を光学顕微鏡で観察して行った。腎臓の検査で好酸体がみられた動物は、 $\alpha 2u$ グロブリンの免疫組織化学的染色を行った。

検査臓器・組織：脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓、鼻腔、気管、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、精巣、精巣上体、精囊・凝固腺、前立腺（腹葉）、卵巣、子宮、膣、膀胱、リンパ節（腋窩・鼠径等）、末梢神経（坐骨神経）、骨髓（大腿骨）、骨（大腿骨）、乳腺、筋肉

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

5.1 性周期の観察

投与開始日から交配開始日までの毎朝、雌動物（サテライト動物は除く）の膣垢を採取・塗抹し、ギムザ染色した標本について、光学顕微鏡を用いて性周期の観察を行った。

性周期は発情前期、発情期及び発情休止期に分類し、発情期が4日から7日の間隔で回帰される例を正常とした。また、1回以上の性周期が得られた動物について、観察期間中の平均性周期を算出した。

5.2 交配

交配期間開始日（投与 15 日）の夕方から交尾が確認されるまで、14 日間を限度として同一群内の雌雄 1 匹ずつを同居させる方法で交配した。交尾の確認は毎朝、膣内の膣栓または膣垢中の精子の存在を調べることにより行い、これらが確認された日を妊娠 0 日と規定した。交尾した雌は直ちに雄から離れた。

交配開始から交尾成立までに要した日数を交尾所要日数とした。また、交配の結果から交尾率〔（交尾成立ペア数／交配ペア数）×100〕を算出した。

5.3 分娩及び哺育

交尾した雌は、妊娠 18 日に床敷を入れた分娩用ケージに移して分娩させた。分娩完了の確認は妊娠 20 日から 1 日 2 回行い、16 時までには分娩が終了していた動物についてはその日を分娩日（哺育 0 日）と規定した。また、分娩中の動物を見た場合にはその状態を観察した。哺育 0 日から哺育 4 日までの毎日、哺育状態の観察を行った。

妊娠 0 日から分娩日までの期間（日数）を妊娠期間とした。また、受胎率〔（受胎動物数／交尾成立ペア数）×100〕と出産率〔（生児出産動物数／受胎動物数）×100〕を算出した。

妊娠 25 日相当日になっても分娩しなかった雌は、翌日（妊娠 26 日相当日）に解剖して妊娠の有無を判定した。

5.4 妊娠黄体数及び着床痕数

交尾した雌は、解剖時に卵巣を摘出して実体顕微鏡により妊娠黄体を計数した。さらに、子宮を摘出して着床痕を計数した。

これらの結果から、着床率〔（着床痕数／妊娠黄体数）×100〕を算出した。

分娩しなかった雌で、着床痕のみられなかった動物は不妊動物とした。

5.5 児動物の観察・検査

1) 出生時の産児数、性及び外表観察

出生時（哺育 0 日）に、産児（生存児・死亡児）の計数、性別確認及び生存児の外表観察を行った。

これらの結果から、分娩率〔（産児数／着床痕数）×100〕、出生率〔（哺育 0 日の生存児数／着床痕数）×100〕、哺育 0 日の生存率〔（哺育 0 日の生存児数／産児数）×100〕、産児の性比（雄の産児数／雌雄の産児数）及び生存児の性比（雄の生存児数／雌雄の生存児数）を算出した。

2) 生存児数及び一般状態の観察

哺育4日まで毎日、生存児の計数と一般状態の観察を行った。

この結果から、哺育4日の生存率〔(哺育4日の生存児数/哺育0日の生存児数) × 100〕及び哺育4日の生存児の性比(哺育4日の雄の生存児数/哺育4日の雌雄の生存児数)を算出した。

3) 体重測定

哺育0日及び哺育4日に生存している児動物は、母動物(腹)毎に雌雄別にまとめた体重を測定し、児動物1匹当りの平均値を算出した。

4) 剖検

哺育4日まで生存した児動物は、エーテル麻酔下で開腹後、腹大動脈切断により放血・致死させ剖検した。胸腔及び腹腔内の臓器は摘出後、母動物(腹)毎に10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定・保存した。また、残余死体はエタノールで固定・保存した。

途中死亡した児動物は、剖検後、胸腔及び腹腔内の臓器は廃棄し、残余死体はエタノールで固定・保存した。

6. 数値処理と統計方法

6.1 数値の取扱いと表示

握力はgを単位とした。整数値の1の位まで測定し、2回の平均値を算出した。平均値の小数点以下第1位を四捨五入して整数値の1の位までを表示した。

自発運動量は10分毎のカウント数と60分間の総カウント数を整数値で表示した。

体重はgを単位として、整数値の1の位まで測定し、表示した。

摂餌量はgを単位として、給餌量及び残餌量を小数点以下第1位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、1日当りの平均摂餌量を算出し、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

血液学検査、血液生化学検査及び血中ホルモン検査はAppendix Bに示した単位と桁数により測定し、表示した。

臓器実重量はgを単位とし、小数点以下第3位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第4位を四捨五入し、小数点以下第3位までを表示した。

性周期は発情期の翌日から次の発情期の終了日までを1性周期とし、観察期間中に観察されたすべての周期の平均を算出し、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

交尾所要日数・妊娠期間・妊娠黄体数・着床痕数・産児数・生存児数の群毎の平均値と標

準偏差は、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

交尾率・受胎率・出産率・着床率・分娩率・出生率・哺育0日の生存率は小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

性比は小数点以下第3位を四捨五入して小数点以下第2位までを表示した。

児動物の体重はgを単位として、雌雄別にまとめた体重は小数点以下第1位まで測定し、その値を測定児数で除し、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

6.2 統計方法

各群の有効動物数は試験に用いた動物数とした。

全ての検査及び測定は実施できた動物数を検査（測定）数とした。

交尾率・受胎率・出産率・尿検査・病理組織学検査の結果は、対照群と各投与群間で χ^2 検定を行った。

その他の検査で得られた数値データは、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重比較を行った。

雌サテライト動物の数値データ及び雄回復動物の回復期間における数値データは、まず、F 検定を行い、分布の違いが認められなかった場合は、Student の t 検定を、分布の違いが認められた場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。

各検定は 5% 及び 1% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示した。

7. 試験の信頼性

1) 病理組織検査する組織の追加

全例について鼻腔の病理組織検査を追加実施した。検査した理由は、一般状態の観察で 500 mg/kg 群の雌雄に開口呼吸（呼吸困難）が観察され、鼻道の閉塞を疑ったことによる。

2) 停電時の飼育環境の変化

施設の電気設備点検に伴う停電時（2010 年 10 月 2 日）に、314 室の湿度が最大 78% まで上昇した。また、停電の間は消灯し換気が停止した。ただし、これらの飼育環境の変化が試験動物に影響を及ぼすことはなかった。

3) 試験成績の信頼性に影響を及ぼすような事態

試験成績の信頼性に影響を及ぼすような事態は認められなかった。

III 試験成績

III-1 反復投与毒性

1. 一般状態 (Table 1)

1.1 雄 (Appendix C 1)

500 mg/kg 群の 7 例に異常呼吸音が認められた。本所見は投与期間中の投与の前後に関係なく、一回のみあるいは断続的に観察された。その中の 1 例には不整呼吸も認められた。

500 mg/kg 群の回復動物 1 例 (動物番号 1309) が回復 8 日に呼吸深大になった。本所見は回復期間終了時まで継続して観察された。糞量の減少と外部生殖器周囲の尿による汚染、最終的には体温の低下も認められた。

20 mg/kg 群及び 100 mg/kg 群の一般状態に投与の影響は認められなかった。

1.2 雌 (Appendix C 2)

500 mg/kg 群のサテライト雌 1 例が投与 10 日に死亡した。本例は死亡する前の状態異常はなく、死亡時の外観にも異常は認められなかった。

投与期間中に 500 mg/kg 群の交配雌 3 例とサテライト雌 2 例の計 5 例に異常呼吸音が認められた。本所見は投与期間中の投与の前後に関係なく、一回のみあるいは断続的に観察された。その中の交配雌 1 例には開口呼吸や不整呼吸、鼻孔周囲の血性分泌物の付着も観察され、腹部が膨満した。本例には自発運動の低下及び外部生殖器周囲の尿による汚染もみられた。ただし、これらの異常は数日間みられたのちに回復した。また、サテライト雌の 1 例にも開口呼吸と不整呼吸が観察されたが 1~2 日で回復した。残る 3 例のうちの 1 例には一時的な深呼吸と鼻孔周囲の血性分泌物の付着が観察された。

500 mg/kg 群には呼吸異常の他に外部生殖器周囲の尿による汚染が観察された。本所見は交配雌の 3 例、サテライト雌の 3 例に一時的に認められた。

上記所見の他に限局性の脱毛が 20 mg/kg 群、100 mg/kg 群及び 500 mg/kg 群の各 1 例にみられたが、投与用量に対応していないため投与と関連しない偶発所見と判断した。

2. 行動機能

2.1 詳細観察所見 (Table 2)

1) 雄 (Appendix D 1)

投与期間中の行動機能に関する詳細観察時には、500 mg/kg 群で異常呼吸音が 4 例、不

整呼吸が 2 例及び鼻孔周囲の汚染が 1 例に認められた。また、回復期間中の 500 mg/kg 群の 1 例には呼吸深大、外部生殖器周囲の汚染及び体温低下が認められた。

20 mg/kg 群と 100 mg/kg 群では全観察項目に投与の影響は認められなかった。

2) 雌 (Appendix D 2)

投与期間中の行動機能に関する詳細観察時には、500 mg/kg 群で異常呼吸音及び外部生殖器周囲の汚染が各 1 例に認められた。回復期間中のサテライト雌に異常所見はみられなかった。

20 mg/kg 群と 100 mg/kg 群では全観察項目に投与の影響は認められなかった。

2.2 反応性 (Table 3)

1) 雄 (Appendix D 3)

投与 6 週に実施した反応性検査時には、全検査項目に投与の影響は認められなかった。

2) 雌 (Appendix D 4)

交配雌は分娩 4 日後（解剖前日）に、サテライト雌は投与 6 週に実施した反応性検査時には、全検査項目に投与の影響は認められなかった。

2.3 握力 (Table 4)

1) 雄 (Appendix D 5)

投与 6 週に実施した握力測定では、前肢・後肢の握力に投与の影響は認められなかった。

2) 雌 (Appendix D 6)

交配雌は分娩 4 日後（解剖前日）に、サテライト雌は投与 6 週に実施した握力測定では、前肢・後肢の握力に投与の影響は認められなかった。

2.4 自発運動量 (Table 5)

1) 雄 (Appendix D 7)

投与 6 週に実施した雄の自発運動量に投与の影響は認められなかった。

2) 雌 (Appendix D 8)

分娩 4 日後（解剖前日）に測定した雌（母動物）では、100 mg/kg 群と 500 mg/kg 群の

測定開始 20 分後から 30 分後の 10 分間の自発運動量に統計学的に有意な低値が認められた。しかし、総測定時間 (60 分間) の自発運動量に統計学的な有意差はみられなかった。また、投与 6 週に 1 回測定した 500 mg/kg 群のサテライト雌では、自発運動量に投与の影響は認められなかった。従って、雌の自発運動量に投与の影響は認められないと判断した。

3. 体重

3.1 雄 (Table 6) (Figure 1) (Appendix E 1)

500 mg/kg 群の体重が投与期間及び回復期間ともに対照群に比較して低値で推移した (統計学的な有意差なし)。回復期間に呼吸の異常がみられた 500 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 1309) の体重は、投与 36 日以後徐々に減少し、呼吸異常が認められた回復 8 日からは著しい減少を示した。

20 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の体重の推移に投与の影響は認められなかった。

3.2 雌 (Table 7, 8) (Figure 2, 3) (Appendix E 2)

交配雌の体重の推移に投与の影響は認められなかった。

500 mg/kg 群のサテライト雌では、投与 29 日の体重が統計学的に有意な低値を示した。ただし、その他の測定日の体重には差がみられなかったため、投与期間中の体重の推移に増加抑制はないと判断した。従って、サテライト雌の体重の推移にも投与の影響は認められなかった。

4. 摂餌量

4.1 雄 (Table 9) (Figure 4) (Appendix F 1)

500 mg/kg 群の投与 1 週の摂餌量が対照群に比較して低値であった (統計学的な有意差なし)。その後の投与期間の摂餌量には対照群との差は認められなかった。また、回復期間に呼吸の異常がみられた 500 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 1309) では、回復 2 週の摂餌量が顕著に減少した。

20 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の摂餌量に投与の影響は認められなかった。

4.2 雌 (Table 10, 11) (Figure 5, 6) (Appendix F 2)

交配雌及びサテライト雌の投与期間中の摂餌量に投与の影響は認められなかった。

500 mg/kg 群のサテライト雌では、回復 1 週及び 2 週の摂餌量が対照群に比較して高値を示した (回復 2 週は統計学的な有意差なし)。

5. 尿検査 (Table 12)

5.1 雄 (Appendix G 1)

投与 6 週に実施した尿検査の結果に投与の影響は認められなかった。

5.2 雌 (Appendix G 2)

投与 6 週にサテライト雌で実施した尿検査の結果、500 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 2508) のグルコースが陽性 (3+) を示した。本例について回復期間終了時に尿中グルコースの有無を検査した結果、陰性であった。

6. 血液学検査

6.1 雄 (Table 13) (Appendix H 1)

投与期間終了時の 500 mg/kg 群に MCH の減少が認められた。本所見は回復期間終了時には認められなかった。

100 mg/kg 群のヘモグロビン濃度が対照群に比較して高値を示した。しかし、500 mg/kg 群には差がみられないため投与の影響ではないと判断した。従って、20 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の血液学検査の結果に投与の影響は認められなかった。

6.2 雌 (Table 14, 15) (Appendix H 2)

20 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の PT が対照群に比較して高値を示し、未分類白血球比 (others で表記) が対照群に比較して低値を示した。しかし、両検査所見ともに 500 mg/kg 群にはみられないため投与の影響ではないと判断した。従って、妊娠・出産雌の血液学検査の結果に投与の影響は認められなかった。

投与期間終了時に 500 mg/kg 群のサテライト雌の APTT が対照群に比較して低値を示した。しかし、妊娠・出産雌にはみられず、回復期間終了時には認められない軽微な変化であるため、投与の影響ではないと判断した。従って、サテライト雌の血液学検査の結果にも投与の影響は認められなかった。

7. 血液生化学検査

7.1 雄 (Table 16) (Appendix I 1)

投与期間終了時の 500 mg/kg 群に総蛋白とアルブミンの減少が認められた。両所見ともに回復期間終了時には認められなかった。

回復期間に呼吸の異常がみられた 500 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 1309) では、ALT と

AST が他の動物に比較して高値を示した (ALT 361 IU/L, AST 383 IU/L)。

20 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の血液生化学検査結果に投与の影響は認められなかった。

7.2 雌 (Table 17, 18) (Appendix I 2)

500 mg/kg 群の妊娠・出産雌に BUN、クレアチニン及び無機リンの減少が認められた。また、500 mg/kg 群のサテライト雌には投与期間終了時に総蛋白の減少と AST の上昇が認められた。これらの変化は回復期間終了時の 500 mg/kg 群のサテライト雌には認められなかった。

回復期間終了時に 500 mg/kg 群のサテライト雌の無機リンが対照群に比較して高値を示したが、投与期間終了時のサテライト雌及び妊娠・出産雌にはみられず、軽微な変化のため投与の影響ではないと判断した。

20 mg/kg 群に総ビリルビンの増加がみられたが、投与用量に対応しない軽微な変化のため投与の影響ではないと判断した。従って、20 mg/kg 群と 100 mg/kg 群の血液生化学検査結果に投与の影響は認められなかった。

8. 血中ホルモン検査 (Table 19)

8.1 雄 (Appendix J 1)

血漿中の T3、T4 及び TSH 濃度の結果に投与の影響は認められなかった。

8.2 雌 (Appendix J 2)

血漿中の T3、T4 及び TSH 濃度の結果に投与の影響は認められなかった。

9. 病理学検査

9.1 剖検 (肉眼観察) (Table 20)

1) 雄 (Appendix K 1)

投与期間終了時に 100 mg/kg 群の 1 例で精巣上体の結節 (片側) が観察された。

回復期間に呼吸異常がみられた 500 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 1309) では、胃から大腸にかけてガスの充満が認められた。また、解剖時に鼻腔へのホルマリン注入ができなかった。

2) 雌 (Appendix K 2)

投与 10 日に死亡した 500 mg/kg 群のサテライト雌 (動物番号 2506) には、胃にガスが充満していた。

投与期間終了時に 100 mg/kg 群の 1 例で肝臓のヘルニア（小さな横隔膜ヘルニア）が観察された。

9.2 臓器重量

1) 雄 (Table 21) (Appendix L 1, M 1)

投与期間終了時の臓器重量に投与の影響は認められなかった。

回復期間終了時に 500 mg/kg 群の腎臓と下垂体の重量体重比が対照群に比較して高値を示し、精巣と精巣上体の実重量が低値を示した。しかし、投与期間終了時には認められなかったこと、また、病理組織学的検査で重量変化と関連のある所見がみられなかったことから投与による遅発性変化ではないと判断した。

2) 雌 (Table 22, 23) (Appendix L 2, M 2)

妊娠・出産雌の臓器重量に投与の影響は認められなかった。

500 mg/kg 群のサテライト雌では、投与期間終了時に肺、腎臓及び脳の重量体重比の増加が認められた。また、回復期間終了時には肝臓と腎臓の実重量及び重量体重比の増加が認められた。

投与期間終了時に 500 mg/kg 群のサテライト雌の搬出時体重が、対照群に比較して低値を示した。これは、投与期間終了時に、対照群の投与期間終了時解剖動物と回復動物の各 5 例の体重に偏りが生じ、投与期間終了時解剖動物に体重値の大きい動物が集まった結果である（投与期間終了時解剖動物：平均 287g、回復動物：平均 263g）。

9.3 病理組織学検査

1) 雄 (Table 24) (Appendix N 1)

検査した全ての組織に投与の影響を示唆する病変は認められなかった。

一般状態の観察で呼吸の異常がみられたことから、全例について鼻腔の組織検査を実施したが、異常は認められなかった。

投与期間終了時の 100 mg/kg 群の 1 例と回復期間終了時の 500 mg/kg 群の 1 例の精巣に精細管の萎縮が観察された。しかし、各群 1 例の片側にみられた軽度または中等度の病変であることから投与の影響ではないと判断した。また、精巣では全例について精子形成サイクルの異常の有無を詳細に観察したが異常は認められなかった。

投与期間終了時及び回復期間終了時に対照群の各 1 例の腎臓に尿細管上皮の好酸体がみられたため、抗 $\alpha 2u$ グロブリン抗体の免疫染色にて陽性であることが確認された。

剖検時の肉眼観察で 100 mg/kg 群の 1 例にみられた精巣上体の結節（片側）は、精子性

肉芽腫と診断された。

2) 雌 (Table 25) (Appendix N 2)

<死亡例> 500 mg/kg 群のサテライト雌 1 例 (動物番号 2506)

喉頭から気管上部にかけて炎症と糜爛が認められた。気管上部には膿による気道閉塞も認められた。また、肺には鬱血と浮腫がみられ、軽度の出血を伴っていた。

<生存例>

検査した全ての組織に投与の影響を示唆する病変は認められなかった。

一般状態の観察で呼吸の異常がみられたことから、全例について鼻腔の組織検査を実施したが、異常は認められなかった。

III-2 生殖発生毒性

1. 性周期 (Table 26) (Appendix O 1)

500 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 2308) は、投与 4 日から交配開始まで発情期が回帰せずに休止期が持続したため異常性周期と判定した。

算出した性周期に投与の影響は認められなかった。

2. 交配成績 (Table 26) (Appendix O 2)

14 日間の交配期間中に全例が交尾をした (最長例は 5 日間)。また、交尾所要日数に群間の差はなく、投与の影響は認められなかった。

100 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 2204) と 500 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 2309) は、妊娠 25 日相当日になっても児の出産がなかったため、妊娠 26 日相当日に剖検した結果、卵巣に妊娠黄体はなく、子宮には胎児や着床痕が観察されなかった。従って 2 例は不妊と判断した。

3. 妊娠及び分娩 (Table 26) (Appendix O 2)

妊娠期間中及び分娩中の雌 (母動物) の状態に異常のみられた例はなかった。また、妊娠期間 (交尾から分娩日までの期間) に投与の影響は認められなかった。

4. 着床 (Table 27) (Appendix P 1)

妊娠黄体数、着床痕数及び着床率に投与の影響は認められなかった。

5. 児動物と哺育 (Table 27, 28)

5.1 出生日 (哺育 0 日) の児動物 (Appendix P 1)

産児の数と性比、分娩率、哺育 0 日の生存児の数と性比、哺育 0 日の生存率及び出生率、雌雄児の体重に投与の影響は認められなかった。また、外表観察で異常のみられた児動物は認められなかった。

5.2 哺育状況と児動物の一般状態 (Appendix O 2, P 2)

哺育状況及び児動物の一般状態に異常はなく、投与の影響は認められなかった。

5.3 哺育 4 日の児動物 (Appendix P 2)

哺育 4 日の生存児の数と性比、生存率及び雌雄生存児の体重に投与の影響は認められなかった。

5.4 剖検 (肉眼観察) (Appendix P 2)

剖検で異常所見のみられた児動物はいなかった。

IV 考察

1. 反復投与毒性

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の反復経口投与に特徴的な所見は、500 mg/kg 群の雌雄にみられた呼吸の異常であった。呼吸異常の多くは異常呼吸音であり、不整呼吸、呼吸深大及び開口呼吸がみられた例もあった。雄の 1 例では呼吸深大が回復期間になってから認められた。本試験の予備試験(100, 300, 600, 1000 mg/kg 14 日間経口投与)では、600 mg/kg 群の雌 1 例と 1000 mg/kg 群の雄 1 例が呼吸困難(開口呼吸)を呈して瀕死状態になり切迫屠殺した。呼吸の異常は 600 mg/kg 群では稀であったが、1000 mg/kg 群の雌雄には不整呼吸や異常呼吸音が認められ、軟便や外部生殖器周囲の尿による汚染もみられた。予備試験で切迫屠殺した動物及び本試験の回復期間になってから呼吸異常がみられた動物では、剖検で胃あるいは胃から大腸にかけての消化管が空気で膨張していた。これは、げっ歯類はヒトと異なり口からの呼吸が困難であるために、鼻道が閉塞した場合の努力呼吸により吸気を消化管内へ誤嚥してしまう結果によると考える。そこで本試験では 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の鼻粘膜への障害性を調べるために鼻腔の病理組織検査を追加実施し、詳細に観察したが、鼻道の閉塞を起こすような炎症等の病変は認められなかった。また、気管や肺にも呼吸困難の原因となるような毒性病変は認められなかった。気道に病変がみられないことから、呼吸困難の原因が呼吸中枢(延髄)の抑制作用によることも考えられるが、その証拠は得られなかった。

サテライト雌の 500 mg/kg 群の 1 例が投与 10 日に突然死亡した。本例の胃には空気が充満し、膨張していた。病理組織検査で喉頭から気管上部にかけて炎症や糜爛があり、膿による気道の閉塞もみられ、肺には鬱血・水腫が認められた。鼻腔を含めた他の臓器・組織に投与に起因するような異常病変はみられなかった。従って、死因は気管上部の閉塞による窒息死であると推定された。ただし、この部位の炎症は他の動物にはみられなかったことから、500 mg/kg 群にみられた呼吸異常との関連性は低いと考える。また、本例の気道病変は、胃ゾンデによる強制経口投与時に粘膜を傷つけた結果の可能性も否定できなかった。以上のことから、本例の死亡は 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の毒性に直接的に起因したものではないと判断し、無毒性量(NOEL)決定の根拠とはしなかった。

一般状態観察では、呼吸異常のほかに、主に雌の 500 mg/kg 群で外部生殖器周囲の尿による汚染が認められた。本所見は一時的にみられた異常であったが、予備試験でも認められた投与による影響である。また、本所見が観察された 500 mg/kg 群のサテライト雌 1 例には、尿検査でグルコースが陽性を示した。ただし、回復期間終了時には陰性になり、回復性が認められた。本例には、病理組織検査で腎臓に尿細管の軽微な再生がみられたが、この所見は対照群の動物にもしばしばみられる病変像であり、外部生殖器周囲の尿による汚染や尿中へのグルコース排出とは関連のないものとする。本例を含む 500 mg/kg 群の雌雄には

腎機能障害を示唆する血中の BUN やクレアチニンの増加はなかった。

500 mg/kg 群のサテライト雌では、投与期間終了時に腎臓、肺及び脳の重量体重比が増加し、回復期間終了時には肝臓及び腎臓の実重量と重量体重比の両方で増加が認められた。投与期間終了時の変化は低体重から算出された重量体重比の高値であり、投与の影響ではないと考える。一方、回復期間終了時の変化は重量体重比だけでなく実重量も高値であることから、肝臓と腎臓にみられた重量増加が投与終了後にみられる遅発性変化である可能性を否定できない。ただし、病理組織検査では両臓器ともに細胞肥大等の適応性変化を含めて組織変化は認められなかった。

雄の 500 mg/kg 群の体重が対照群に比較して低値で推移し、体重増加の抑制傾向がみられた。雌の体重推移に投与の影響は認められなかった。

血液学検査で雄の 500 mg/kg 群に MCH の減少がみられた。また、血液生化学検査で雄の 500 mg/kg 群に総蛋白とアルブミンの減少、雌では 500 mg/kg 群の妊娠・出産雌に BUN、クレアチニン及び無機リンの減少、サテライト雌に総蛋白の減少と AST の上昇が認められた。雌雄に共通してみられた所見は総蛋白の減少であった。本所見を含めて雌雄の 500 mg/kg 群にみられた変化はそれぞれに明らかな関連性がなく、回復性があり、投与との関連は不明である。ただし、高用量にみられた変化であるため、投与の影響を否定できなかった。

2. 生殖発生毒性

交配前の性周期観察で 500 mg/kg 群の 1 例に発情期の回帰がみられない性周期異常が観察された。本例は交配が成立し、児を出産したことから生殖能力や妊娠・出産には影響は及ぼさなかった。

14 日間の交配期間中に全例が交尾をしたが、100 mg/kg 群と 500 mg/kg 群の各 1 例は不妊であった。不妊は各群 1 例であり、一般状態、体重、病理学検査などに不妊の原因となるような異常は雌雄ともにみられなかったことから、偶発的であり、投与の影響ではないと判断した。

雌雄の生殖器・副生殖器や精巣の精子形成サイクルに投与の影響はなく、児動物の発生・発育に及ぼす影響も認められなかった。

3. 無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

本試験における 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の反復経口投与により、500 mg/kg 群の雌雄に呼吸の異常などの影響がみられ、100 mg/kg 群にはみられなかったことから反復投与毒性に関する NOAEL は雌雄ともに 100 mg/kg/day と結論される。また、500 mg/kg 群で雌雄親動物の生殖能力や児動物の発生・発育に投与の影響がみられなかったことから、生殖発生毒性に関する NOAEL は 500 mg/kg/day であると結論される。

V 文献

- 1) OECD. 1996. OECD Guideline for Testing of Chemicals 422 “Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test”, Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- 2) 関東化学(株). 2004. m-キシレン-4-スルホン酸 n 水和物「製品安全データシート」.
- 3) 関東化学(株). 2010. m-キシレン-4-スルホン酸 n 水和物, 試験成績書.
- 4) 独立行政法人 産業技術総合研究所提供資料: 有機化合物のスペクトルデータベース (SDBS) . m-Xylene-4-sulfonic acid. <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/> [アクセス 2010 年 6 月 22 日].
- 5) 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット, マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 14 : 7285-7302.

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸のラットを用いた
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：0765

TABLES

Table 1 General clinical observations of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
	0	20	100	500	0	500
Male						
No. of animals examined	12	12	12	12	5	5
No. of live animals	12	12	12	12	5	5
No. of dead animals	0	0	0	0	0	0
Findings ¹⁾						
No abnormalities detected	12	12	12	5	5	4
Respiratory noise	0	0	0	7	0	0
Irregular respiration	0	0	0	1	0	0
Deep respiration	0	0	0	0	0	1
Soiled perigenital region	0	0	0	0	0	1
Oligo-stool	0	0	0	0	0	1
Hypothermia	0	0	0	0	0	1
Female						
No. of animals examined	12 (10)	12	12	12 (10)	(5)	(4)
No. of live animals	12 (10)	12	12	12 (9)	(5)	(4)
No. of dead animals	0 (0)	0	0	0 (1)	(0)	(0)
Findings ¹⁾						
No abnormalities detected	12 (10)	11	11	7 (5)	(5)	(4)
Respiratory noise	0 (0)	0	0	3 (2)	(0)	(0)
Irregular respiration	0 (0)	0	0	1 (1)	(0)	(0)
Deep respiration	0 (0)	0	0	1 (0)	(0)	(0)
Oral breathing	0 (0)	0	0	1 (1)	(0)	(0)
Nasal hemorrhagic discharge	0 (0)	0	0	2 (0)	(0)	(0)
Soiled perigenital region	0 (0)	0	0	3 (3)	(0)	(0)
Loss of fur	0 (0)	1	1	1 (0)	(0)	(0)
Decrease in locomotor activity	0 (0)	0	0	1 (0)	(0)	(0)
Flatulence	0 (0)	0	0	1 (0)	(0)	(0)

¹⁾ Data represent the number of animals.

Parentheses represent the number of satellite females.

Table 2 Detailed clinical observations (functional observational battery) of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Administration period								Recovery period			
	Male				Female				Male		Female	
	0	20	100	500	0	20	100	500	0	500	0	500
No. of animals examined	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Removal from cage												
Touch response												
Normal	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Ease of removal												
Easy	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Handling observation												
Ease of handling												
Easy	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Temperature of the skin												
Normal	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	4	(5)	(4)
Low	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	1	(0)	(0)
Hair coat												
Normal	12	12	12	11	12(10)	12	12	11(10)	5	4	(5)	(4)
Soiled, perinasal	0	0	0	1	0(0)	0	0	0(0)	0	0	(0)	(0)
Soiled, perigenital	0	0	0	0	0(0)	0	0	1(0)	0	1	(0)	(0)
Complexion												
Normal	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Eye												
Normal	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Salivation												
None	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Urination												
None	10	11	11	11	11(10)	11	12	11(10)	5	5	(5)	(4)
Observed	2	1	1	1	1(0)	1	0	1(0)	0	0	(0)	(0)
Defecation												
None	10	9	10	11	11(10)	12	11	12(9)	5	5	(5)	(4)
Observed	2	3	2	1	1(0)	0	1	0(1)	0	0	(0)	(0)
Observation in arena												
Posture												
Normal	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Activity												
Normal	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Exploration												
Normal	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Gait												
Normal	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Stereotypy												
None	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)
Respiration												
Normal	12	12	12	8	12(10)	12	12	11(10)	5	4	(5)	(4)
Noise	0	0	0	4	0(0)	0	0	1(0)	0	0	(0)	(0)
Irregular	0	0	0	2	0(0)	0	0	0(0)	0	0	(0)	(0)
Deep	0	0	0	0	0(0)	0	0	0(0)	0	1	(0)	(0)
Tremor/twitch/convulsion												
None	12	12	12	12	12(10)	12	12	12(10)	5	5	(5)	(4)

Data represent the number of animals.

Parentheses represent the number of satellite females.

Table 3 Reflex/reactions (functional observational battery) of rats treated orally with
2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental
toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Male				Female			
	0	20	100	500	0	20	100	500
No. of animals examined	12	12	12	12	5 (10)	5	5	5 (9)
Visual forelimb placing response								
Normal	12	12	12	12	5 (10)	5	5	5 (9)
Auditory reactivity								
Normal	12	12	12	12	5 (10)	5	5	5 (9)
Tail pinch response								
Normal	12	12	12	12	5 (10)	5	5	5 (9)
Pupillary reflex								
Normal	12	12	12	12	5 (10)	5	5	5 (9)
Aerial righting reaction								
Normal	12	12	12	12	5 (10)	5	5	5 (9)

Data represent the number of animals.

Parentheses represent the number of satellite females.

Table 4 Grip strength (functional observational battery) of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
Male				
No. of animals examined	12	12	12	12
Forelimb grip strength (g)	395 ± 116	366 ± 80	410 ± 118	372 ± 90
Hindlimb grip strength (g)	393 ± 89	370 ± 41	411 ± 52	383 ± 88
Female (dam)				
No. of animals examined	5	5	5	5
Forelimb grip strength (g)	229 ± 40	237 ± 86	255 ± 37	312 ± 81
Hindlimb grip strength (g)	217 ± 65	208 ± 66	206 ± 45	203 ± 29
Female (satellite)				
No. of animals examined	10	—	—	9
Forelimb grip strength (g)	195 ± 75	—	—	198 ± 45
Hindlimb grip strength (g)	211 ± 60	—	—	247 ± 48

Data represent mean ± S.D.

Table 5 Locomotor activity (functional observational battery) of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Administration period			
	0	20	100	500
Male				
No. of animals	12	12	12	12
Interval count				
0 - 10 (min)	2674 ± 693	2851 ± 1275	2430 ± 1436	2241 ± 1130
10 - 20 (min)	1394 ± 774	1399 ± 971	1082 ± 1015	1448 ± 828
20 - 30 (min)	816 ± 850	954 ± 924	654 ± 972	703 ± 791
30 - 40 (min)	837 ± 763	1162 ± 1195	764 ± 739	547 ± 417
40 - 50 (min)	958 ± 824	609 ± 792	596 ± 633	353 ± 405
50 - 60 (min)	822 ± 763	427 ± 504	419 ± 603	430 ± 459
Total count				
0 - 60 (min)	7501 ± 3411	7403 ± 4580	5944 ± 4589	5723 ± 3084
Female (dam)				
No. of animals	5	5	5	5
Interval count				
0 - 10 (min)	2236 ± 932	2824 ± 581	2290 ± 1423	1771 ± 1553
10 - 20 (min)	1461 ± 932	1049 ± 916	1005 ± 1066	715 ± 973
20 - 30 (min)	1479 ± 209	2005 ± 1554	414 ± 434 **	30 ± 19 **
30 - 40 (min)	773 ± 1064	1127 ± 1531	564 ± 971	17 ± 25
40 - 50 (min)	927 ± 703	420 ± 697	509 ± 652	729 ± 1059
50 - 60 (min)	688 ± 809	108 ± 189	1113 ± 1427	673 ± 934
Total count				
0 - 60 (min)	7564 ± 2414	7533 ± 1690	5895 ± 4582	3936 ± 3582
Female (satellite)				
No. of animals	10	—	—	9
Interval count				
0 - 10 (min)	2709 ± 1547	—	—	3484 ± 1118
10 - 20 (min)	1602 ± 1381	—	—	1605 ± 1221
20 - 30 (min)	1454 ± 1514	—	—	1413 ± 1395
30 - 40 (min)	1380 ± 1308	—	—	1092 ± 924
40 - 50 (min)	798 ± 1159	—	—	1450 ± 1556
50 - 60 (min)	877 ± 1242	—	—	454 ± 629
Total count				
0 - 60 (min)	8819 ± 7012	—	—	9498 ± 4947

Data represent mean ± S.D.

** $p \leq 0.01$.

Table 6 Body weight changes of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
Administration period				
No. of animals examined	12	12	12	12
Days of administration				
1	389 ± 19	389 ± 19	389 ± 20	389 ± 20
8	410 ± 25	406 ± 22	407 ± 24	385 ± 26
15	436 ± 28	431 ± 24	429 ± 28	409 ± 27
22	456 ± 30	448 ± 25	444 ± 28	429 ± 30
29	479 ± 34	472 ± 29	464 ± 32	452 ± 30
36	501 ± 34	493 ± 32	484 ± 36	473 ± 31
42	514 ± 38	505 ± 31	494 ± 37	484 ± 31
Recovery period				
No. of animals examined	5	—	—	5
Days of recovery				
1	524 ± 36	—	—	493 ± 22
8	538 ± 41	—	—	501 ± 24
14	560 ± 42	—	—	502 ± 71

Data represent mean ± S.D. (g).

Table 7 Body weight changes of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
Premating period				
No. of animals examined	12	12	12	12
Days of administration				
1	233 $\pm$ 9	233 $\pm$ 9	233 $\pm$ 9	233 $\pm$ 9
8	244 $\pm$ 12	237 $\pm$ 11	240 $\pm$ 12	239 $\pm$ 13
15	249 $\pm$ 16	240 $\pm$ 14	248 $\pm$ 14	246 $\pm$ 20
Pregnant period				
No. of animals examined	12	12	11	11
Days of pregnancy				
0	255 $\pm$ 15	248 $\pm$ 11	254 $\pm$ 13	253 $\pm$ 13
7	298 $\pm$ 12	288 $\pm$ 13	297 $\pm$ 10	295 $\pm$ 19
14	340 $\pm$ 12	327 $\pm$ 15	337 $\pm$ 9	335 $\pm$ 21
20	426 $\pm$ 12	410 $\pm$ 23	421 $\pm$ 13	413 $\pm$ 31
Lactation period				
No. of animals examined	12	12	11	11
Days of lactation				
0	318 $\pm$ 17	312 $\pm$ 16	310 $\pm$ 24	318 $\pm$ 23
4	333 $\pm$ 20	328 $\pm$ 14	327 $\pm$ 14	335 $\pm$ 17

Data represent mean $\pm$ S.D. (g).

Table 8 Body weight changes of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	500
Administration period		
No. of animals examined	-10	10
Days of administration		
1	234 ± 9	234 ± 9
8	242 ± 9	237 ± 12
15	246 ± 10	240 ± 14 ¹⁾
22	252 ± 10	244 ± 12 ¹⁾
29	263 ± 15	250 ± 10 * ¹⁾
36	272 ± 16	260 ± 15 ¹⁾
42	275 ± 15	266 ± 14 ¹⁾
Recovery period		
No. of animals examined	5	4
Days of recovery		
1	268 ± 7	257 ± 18
8	271 ± 7	280 ± 14
14	281 ± 4	290 ± 18

Data represent mean ± S.D. (g).

* $p \leq 0.05$.

¹⁾ The number of animals is 9.

Table 9 Food consumption changes of male rats treated orally with 2;4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
Administration period				
No. of animals examined	12	12	12	12
Days of administration				
1 - 8	24.1 ± 2.0	24.4 ± 1.5	23.7 ± 1.8	20.1 ± 5.0
8 - 15	24.3 ± 1.5	24.3 ± 1.5	23.5 ± 1.7	25.2 ± 2.4
29 - 36	26.2 ± 1.7	26.6 ± 2.0	25.3 ± 2.2	26.1 ± 2.2
36 - 42	26.0 ± 1.6	26.3 ± 1.8	25.1 ± 2.1	25.9 ± 1.9
Recovery period				
No. of animals examined	5	—	—	5
Days of recovery				
1 - 8	26.4 ± 2.9	—	—	25.6 ± 2.3
8 - 14	26.4 ± 2.7	—	—	21.8 ± 11.8

Data represent mean ± S.D. (g/day).

Table 10 Food consumption changes of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
Premating period				
No. of animals examined	12	12	12	12
Days of administration				
1 - 8	17.7 ± 1.3	16.6 ± 1.5	17.3 ± 1.4	17.0 ± 2.0
8 - 15	16.5 ± 1.6	15.8 ± 1.2	16.9 ± 1.6	17.2 ± 2.8
Pregnant period				
No. of animals examined	12	12	11	11
Days of pregnancy				
0 - 7	22.8 ± 1.2	21.9 ± 1.6	23.3 ± 1.9	24.3 ± 2.0
7 - 14	25.4 ± 1.7	24.8 ± 2.0	25.2 ± 1.9	26.4 ± 2.6
14 - 20	27.2 ± 2.0	26.7 ± 2.3	27.3 ± 2.1	27.0 ± 4.2
Lactation period				
No. of animals examined	12	12	11	11
Days of lactation				
0 - 4	31.4 ± 5.2	31.7 ± 3.5	30.9 ± 4.0	33.1 ± 5.7

Data represent mean ± S.D. (g/day).

Table 11 Food consumption changes of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	500
Administration period		
No. of animals examined	10	10
Days of administration		
1 - 8	17.0 ± 0.5	16.3 ± 2.0
8 - 15	16.3 ± 0.5	16.1 ± 2.6 ¹⁾
29 - 36	17.1 ± 0.6	18.0 ± 2.3 ²⁾
36 - 42	17.0 ± 0.9	17.3 ± 1.8 ²⁾
Recovery period		
No. of animals examined	5	4
Days of recovery		
1 - 8	18.0 ± 1.0	19.5 ± 0.6 *
8 - 14	18.2 ± 0.7	19.6 ± 1.9

Data represent mean ± S.D. (g).

* $p \leq 0.05$.

¹⁾ including an animal died on day 10

²⁾ The number of animals is 9.

Table 12 Urinalysis of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		Male				Satellite female	
		0	20	100	500	0	500
Male							
No. of animals examined		12	12	12	12	10	9
pH	6.0	0	0	0	0	1	1
	7.0	0	0	0	1	0	1
	7.5	0	0	0	1	2	1
	8.0	7	4	5	5	1	3
	8.5	5	8	7	5	6	3
Protein	—	0	0	0	0	0	0
	+	4	5	4	3	5	5
	2+	8	7	7	8	5	4
	3+	0	0	1	1	0	0
Glucose	—	12	12	12	12	10	8
	3+	0	0	0	0	0	1
Ketone body	—	3	3	1	3	4	7
	±	8	8	11	8	6	2
	+	1	1	0	1	0	0
Bilirubin	—	12	12	12	12	10	9
Occult blood	—	12	12	12	11	10	9
	±	0	0	0	1	0	0
Urobilinogen	±	12	12	12	12	10	9

Grade: —: negative, ±: trace, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked.

Data represent the number of animals.

Table 13 Hematology of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	20	100	500	0	500
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.68 $\pm$ 0.28	9.05 $\pm$ 0.25	9.02 $\pm$ 0.36	9.00 $\pm$ 0.38	9.04 $\pm$ 0.34	9.26 $\pm$ 1.12
Hemoglobin (g/dL)	15.5 $\pm$ 0.5	16.0 $\pm$ 0.4	16.1 $\pm$ 0.5 *	15.4 $\pm$ 0.3	15.8 $\pm$ 0.6	16.6 $\pm$ 1.6
Hematocrit (%)	44.6 $\pm$ 2.2	46.3 $\pm$ 1.1	46.3 $\pm$ 1.8	45.0 $\pm$ 1.4	46.1 $\pm$ 1.7	48.6 $\pm$ 5.7
MCV (fL)	51.4 $\pm$ 1.1	51.2 $\pm$ 1.2	51.3 $\pm$ 1.3	50.1 $\pm$ 1.7	51.0 $\pm$ 1.1	52.6 $\pm$ 2.2
MCH (pg)	17.8 $\pm$ 0.3	17.7 $\pm$ 0.4	17.9 $\pm$ 0.6	17.1 $\pm$ 0.7 *	17.5 $\pm$ 0.3	17.9 $\pm$ 0.7
MCHC (g/dL)	34.7 $\pm$ 0.6	34.5 $\pm$ 0.4	34.8 $\pm$ 0.7	34.2 $\pm$ 0.6	34.3 $\pm$ 0.3	34.1 $\pm$ 0.7
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1084 $\pm$ 137	1036 $\pm$ 153	1074 $\pm$ 131	1176 $\pm$ 119	1110 $\pm$ 73	985 $\pm$ 138
Reticulocyte (%)	1.8 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.4
PT (sec)	20.7 $\pm$ 2.9	19.8 $\pm$ 4.7	20.0 $\pm$ 4.4	19.2 $\pm$ 3.6	16.5 $\pm$ 2.1	18.9 $\pm$ 3.8
APTT (sec)	24.4 $\pm$ 1.5	24.0 $\pm$ 3.2	24.2 $\pm$ 2.2	24.6 $\pm$ 2.0	21.1 $\pm$ 1.6	22.8 $\pm$ 2.1
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	12.25 $\pm$ 2.58	11.47 $\pm$ 2.12	12.74 $\pm$ 2.82	12.42 $\pm$ 4.90	12.52 $\pm$ 3.70	10.28 $\pm$ 2.41
Differential WBC (%)						
Neutrophil	16.6 $\pm$ 3.9	16.6 $\pm$ 3.3	15.2 $\pm$ 3.3	15.8 $\pm$ 3.7	20.2 $\pm$ 5.3	18.1 $\pm$ 3.5
Lymphocyte	78.2 $\pm$ 3.7	78.2 $\pm$ 3.0	80.0 $\pm$ 3.3	79.7 $\pm$ 3.8	74.7 $\pm$ 5.0	74.9 $\pm$ 5.4
Monocyte	2.3 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 0.7	2.2 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.7	3.3 $\pm$ 1.6
Eosinophil	1.6 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.7
Basophil	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.1
Others	1.0 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.9

Data represent mean $\pm$ S.D.* $p \leq 0.05$.

Table 14 Hematology of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
No. of animals examined	12	12	11	11
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7.00 ± 0.24	7.20 ± 0.35	6.88 ± 0.39	6.90 ± 0.28
Hemoglobin (g/dL)	13.6 ± 0.6	13.9 ± 0.8	13.3 ± 0.8	13.4 ± 0.6
Hematocrit (%)	38.3 ± 1.5	39.3 ± 2.2	38.0 ± 2.3	37.9 ± 1.7
MCV (fL)	54.7 ± 1.8	54.7 ± 2.2	55.2 ± 1.2	55.1 ± 1.4
MCH (pg)	19.4 ± 0.7	19.3 ± 0.7	19.3 ± 0.6	19.5 ± 0.6
MCHC (g/dL)	35.4 ± 0.4	35.3 ± 0.2	34.9 ± 0.8	35.4 ± 0.5
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1150 ± 195	1098 ± 112	1231 ± 183	1281 ± 155
Reticulocyte (%)	5.2 ± 1.2	4.7 ± 0.9	5.7 ± 1.4	5.0 ± 0.9
PT (sec)	13.3 ± 0.5	$13.8 \pm 0.6^*$	$13.9 \pm 0.5^*$	13.3 ± 0.4
APTT (sec)	17.0 ± 1.2	16.4 ± 1.4	16.2 ± 0.8	16.9 ± 1.0
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	13.37 ± 3.47	12.24 ± 2.72	12.01 ± 2.60	11.63 ± 3.25
Differential WBC (%)				
Neutrophil	40.0 ± 8.1	39.8 ± 12.5	38.0 ± 7.1	36.8 ± 9.9
Lymphocyte	54.3 ± 8.2	55.4 ± 12.3	57.6 ± 6.7	58.8 ± 10.2
Monocyte	3.4 ± 1.1	3.1 ± 0.8	2.8 ± 1.1	2.5 ± 0.9
Eosinophil	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.4
Basophil	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Others	1.2 ± 0.5	$0.7 \pm 0.4^*$	$0.8 \pm 0.3^*$	0.9 ± 0.4

Data represent mean $\pm$ S.D.* $p \leq 0.05$.

Table 15 Hematology of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period		At the end of recovery period	
	0	500	0	500
No. of animals examined	5	5	5	4
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7.90 $\pm$ 0.18	8.07 $\pm$ 0.26	8.17 $\pm$ 0.27	8.47 $\pm$ 0.09
Hemoglobin (g/dL)	14.7 $\pm$ 0.4	14.6 $\pm$ 0.5	15.2 $\pm$ 0.5	15.2 $\pm$ 0.4
Hematocrit (%)	40.8 $\pm$ 1.0	41.1 $\pm$ 1.3	43.1 $\pm$ 1.3	43.9 $\pm$ 1.2
MCV (fL)	51.7 $\pm$ 0.9	50.9 $\pm$ 1.9	52.8 $\pm$ 1.5	51.9 $\pm$ 1.0
MCH (pg)	18.6 $\pm$ 0.4	18.1 $\pm$ 0.7	18.5 $\pm$ 0.6	18.0 $\pm$ 0.3
MCHC (g/dL)	36.0 $\pm$ 0.2	35.6 $\pm$ 0.5	35.1 $\pm$ 0.4	34.6 $\pm$ 0.5
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1261 $\pm$ 273	1271 $\pm$ 59	1094 $\pm$ 95	1009 $\pm$ 82
Reticulocyte (%)	1.8 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.5
PT (sec)	12.4 $\pm$ 0.6	12.3 $\pm$ 0.9	12.6 $\pm$ 0.7	11.9 $\pm$ 0.7
APTT (sec)	17.5 $\pm$ 0.7	16.3 $\pm$ 0.8 *	15.7 $\pm$ 1.0	16.9 $\pm$ 0.5
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5.37 $\pm$ 0.92	7.26 $\pm$ 2.64	5.43 $\pm$ 1.22	5.60 $\pm$ 1.31
Differential WBC (%)				
Neutrophil	17.4 $\pm$ 3.7	15.9 $\pm$ 5.7	19.1 $\pm$ 7.3	14.7 $\pm$ 5.1
Lymphocyte	77.8 $\pm$ 3.0	79.2 $\pm$ 5.4	77.0 $\pm$ 7.5	79.5 $\pm$ 7.2
Monocyte	2.2 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.9	1.6 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 1.5
Eosinophil	1.8 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 1.1	1.6 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.5
Basophil	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
Others	0.5 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 1.1

Data represent mean $\pm$ S.D.* $p \leq 0.05$.

Table 16 Biochemistry of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	20	100	500	0	500
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
Total protein (g/dL)	6.1 ± 0.3	6.1 ± 0.3	6.1 ± 0.2	5.7 ± 0.2 *	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.1 ± 0.1 *	3.3 ± 0.2	3.2 ± 0.1
A/G ratio	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1
Total bilirubin (mg/dL)	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02
Glucose (mg/dL)	178 ± 20	169 ± 26	183 ± 25	158 ± 20	184 ± 18	180 ± 13
Total cholesterol (mg/dL)	54 ± 12	55 ± 16	55 ± 11	60 ± 5	56 ± 7	60 ± 5
Triglyceride (mg/dL)	32 ± 7	29 ± 18	39 ± 27	32 ± 16	56 ± 26	42 ± 26
Phospholipid (mg/dL)	94 ± 17	92 ± 19	94 ± 16	97 ± 9	96 ± 15	100 ± 5
AST (IU/L)	68 ± 4	67 ± 6	62 ± 6	68 ± 7	67 ± 16	122 ± 134
ALT (IU/L)	27 ± 2	29 ± 6	26 ± 3	26 ± 4	26 ± 6	96 ± 160
LDH (IU/L)	91 ± 20	107 ± 25	103 ± 30	116 ± 23	108 ± 31	120 ± 39
ALP (IU/L)	362 ± 75	357 ± 53	349 ± 72	378 ± 43	370 ± 108	309 ± 45
γ-GTP (IU/L)	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
CK (IU/L)	97 ± 14	106 ± 18	104 ± 17	103 ± 13	98 ± 18	124 ± 34
BUN (mg/dL)	15.2 ± 1.3	16.3 ± 2.3	15.2 ± 1.2	15.3 ± 1.9	15.5 ± 3.7	14.2 ± 3.8
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Na (mEq/L)	142 ± 1	143 ± 1	142 ± 1	143 ± 1	142 ± 2	143 ± 2
K (mEq/L)	3.7 ± 0.3	3.9 ± 0.3	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.3	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2
Cl (mEq/L)	107 ± 1	106 ± 2	107 ± 1	107 ± 1	106 ± 3	104 ± 4
Ca (mg/dL)	10.2 ± 0.2	10.2 ± 0.3	10.1 ± 0.4	9.9 ± 0.2	10.1 ± 0.2	9.9 ± 0.3
IP (mg/dL)	7.0 ± 0.6	6.9 ± 0.6	6.9 ± 0.7	6.7 ± 0.6	6.0 ± 0.4	6.3 ± 0.8

Data represent mean ± S.D.

* $p \leq 0.05$.

Table 17 Biochemistry of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
No. of animals examined	12	12	11	11
Total protein (g/dL)	6.4 ± 0.3	6.4 ± 0.3	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.2
A/G ratio	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.02 *	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Glucose (mg/dL)	158 ± 17	153 ± 15	150 ± 11	159 ± 15
Total cholesterol (mg/dL)	59 ± 12	58 ± 10	55 ± 10	62 ± 17
Triglyceride (mg/dL)	36 ± 19	39 ± 24	42 ± 26	43 ± 22
Phospholipid (mg/dL)	120 ± 22	118 ± 14	114 ± 24	127 ± 29
AST (IU/L)	88 ± 9	88 ± 20	87 ± 16	79 ± 12
ALT (IU/L)	46 ± 8	45 ± 10	46 ± 8	43 ± 6
LDH (IU/L)	129 ± 37	137 ± 32	128 ± 22	114 ± 34
ALP (IU/L)	271 ± 114	214 ± 36	222 ± 54	244 ± 79
γ-GTP (IU/L)	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
CK (IU/L)	106 ± 12	104 ± 15	111 ± 14	106 ± 20
BUN (mg/dL)	19.6 ± 2.9	20.2 ± 2.5	19.6 ± 1.9	16.0 ± 2.2 **
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1 **
Na (mEq/L)	143 ± 2	143 ± 1	143 ± 2	142 ± 1
K (mEq/L)	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.4	3.5 ± 0.3	3.7 ± 0.3
Cl (mEq/L)	107 ± 2	106 ± 2	107 ± 2	107 ± 1
Ca (mg/dL)	10.6 ± 0.5	10.6 ± 0.4	10.5 ± 0.4	10.4 ± 0.3
IP (mg/dL)	8.2 ± 1.2	8.2 ± 0.8	8.5 ± 0.9	7.1 ± 1.1 *

Data represent mean ± S.D.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 18 Biochemistry of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period		At the end of recovery period	
	0	500	0	500
No. of animals examined	5	5	5	4
Total protein (g/dL)	6.9 ± 0.3	6.3 ± 0.4 *	6.6 ± 0.3	6.8 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.9 ± 0.3	3.7 ± 0.3	3.9 ± 0.3	4.0 ± 0.1
A/G ratio	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Total bilirubin (mg/dL)	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01
Glucose (mg/dL)	139 ± 23	144 ± 20	158 ± 18	161 ± 9
Total cholesterol (mg/dL)	57 ± 11	69 ± 7	64 ± 10	68 ± 9
Triglyceride (mg/dL)	14 ± 12	13 ± 5	15 ± 6	22 ± 16
Phospholipid (mg/dL)	117 ± 29	134 ± 18	129 ± 24	139 ± 20
AST (IU/L)	60 ± 8	89 ± 25 *	58 ± 7	74 ± 25
ALT (IU/L)	26 ± 5	39 ± 24	21 ± 7	28 ± 12
LDH (IU/L)	104 ± 38	100 ± 40	89 ± 44	110 ± 44
ALP (IU/L)	177 ± 36	208 ± 46	176 ± 35	136 ± 78
γ-GTP (IU/L)	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
CK (IU/L)	80 ± 11	77 ± 12	70 ± 15	75 ± 18
BUN (mg/dL)	16.4 ± 2.2	17.1 ± 1.5	16.6 ± 1.7	17.0 ± 0.9
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.1
Na (mEq/L)	141 ± 1	142 ± 1	142 ± 0	142 ± 1
K (mEq/L)	3.7 ± 0.3	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.2
Cl (mEq/L)	107 ± 1	108 ± 1	109 ± 1	109 ± 1
Ca (mg/dL)	10.1 ± 0.2	9.8 ± 0.3	9.9 ± 0.2	10.0 ± 0.3
IP (mg/dL)	4.4 ± 0.7	3.9 ± 0.8	3.3 ± 0.2	3.6 ± 0.1 *

Data represent mean ± S.D.

* p ≤ 0.05.

Table 19 Hormone analysis of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	20	100	500	0	500
Male						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
T3 (ng/mL)	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.0	1.9 ± 0.3	1.9 ± 0.1
T4 (ng/mL)	106.7 ± 9.9	101.5 ± 14.0	96.2 ± 17.0	94.2 ± 9.5	92.2 ± 9.2	84.9 ± 16.2
TSH (ng/mL)	3.3 ± 2.5	2.2 ± 1.8	2.7 ± 2.5	2.8 ± 3.9	1.8 ± 0.5	1.7 ± 1.0
Female (dam)						
No. of animals examined	12	12	11	11	—	—
T3 (ng/mL)	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.3	—	—
T4 (ng/mL)	78.2 ± 6.4	80.4 ± 14.0	74.9 ± 7.9	73.8 ± 7.4	—	—
TSH (ng/mL)	1.3 ± 0.7	0.9 ± 0.5	1.3 ± 1.2	0.9 ± 0.5	—	—
Female (satellite)						
No. of animals examined	5	—	—	5	5	4
T3 (ng/mL)	2.0 ± 0.1	—	—	2.1 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.2
T4 (ng/mL)	70.2 ± 5.0	—	—	76.7 ± 9.2	63.7 ± 4.7	62.5 ± 5.7
TSH (ng/mL)	0.8 ± 0.3	—	—	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1

Data represent mean ± S.D.

Table 20 Gross findings of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	20	100	500	0	500
Male						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
Non-remarkable	7	12	11	7	5	4
Epididymis, nodule	0	0	1	0	0	0
Stomach/intestines, gas	0	0	0	0	0	1
Female						
No. of animals examined	12 (5)	12	12	12 (5)	(5)	(4) ¹⁾
Non-remarkable	12 (5)	12	11	12 (5)	(5)	(4)
Liver, herniation	0 (0)	0	1	0 (0)	(0)	(0)

Data represent the number of animals.

Parentheses represent the number of satellite females.

¹⁾ 1 female died during administration period. This animal exhibited gaseous distension of the stomach at necropsy.

Table 21 Organ weights of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	20	100	500	0	500
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
Body weight (g)	472 ± 32	473 ± 31	462 ± 34	448 ± 32	527 ± 37	473 ± 59
Thymus (g)	0.476 ± 0.081	0.401 ± 0.096	0.427 ± 0.072	0.360 ± 0.053	0.516 ± 0.055	0.420 ± 0.144
(%)	0.101 ± 0.018	0.085 ± 0.021	0.093 ± 0.016	0.080 ± 0.009	0.098 ± 0.012	0.087 ± 0.024
Adrenals (g)	0.066 ± 0.013	0.069 ± 0.009	0.066 ± 0.006	0.069 ± 0.008	0.064 ± 0.005	0.072 ± 0.014
(%)	0.014 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.014 ± 0.002	0.016 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.016 ± 0.005
Heart (g)	1.445 ± 0.144	1.427 ± 0.121	1.429 ± 0.083	1.357 ± 0.148	1.671 ± 0.354	1.444 ± 0.099
(%)	0.306 ± 0.021	0.303 ± 0.026	0.310 ± 0.021	0.304 ± 0.025	0.319 ± 0.078	0.309 ± 0.039
Lungs (g)	1.457 ± 0.129	1.479 ± 0.098	1.453 ± 0.110	1.454 ± 0.083	1.541 ± 0.103	1.435 ± 0.095
(%)	0.308 ± 0.013	0.314 ± 0.024	0.315 ± 0.021	0.326 ± 0.027	0.294 ± 0.037	0.307 ± 0.041
Kidneys (g)	2.981 ± 0.233	3.006 ± 0.254	2.924 ± 0.197	2.862 ± 0.315	2.980 ± 0.168	2.886 ± 0.400
(%)	0.631 ± 0.020	0.637 ± 0.057	0.634 ± 0.032	0.640 ± 0.062	0.566 ± 0.022	0.610 ± 0.032 *
Spleen (g)	0.813 ± 0.155	0.726 ± 0.103	0.762 ± 0.086	0.734 ± 0.069	0.780 ± 0.157	0.619 ± 0.188
(%)	0.171 ± 0.023	0.154 ± 0.024	0.166 ± 0.026	0.164 ± 0.017	0.147 ± 0.020	0.128 ± 0.028
Liver (g)	11.912 ± 1.037	11.498 ± 1.312	11.177 ± 1.300	11.342 ± 0.909	13.240 ± 2.226	11.425 ± 2.248
(%)	2.521 ± 0.082	2.427 ± 0.164	2.417 ± 0.160	2.535 ± 0.129	2.497 ± 0.263	2.402 ± 0.278
Brain (g)	2.092 ± 0.083	2.144 ± 0.090	2.126 ± 0.070	2.094 ± 0.061	2.115 ± 0.059	2.066 ± 0.038
(%)	0.444 ± 0.023	0.455 ± 0.035	0.462 ± 0.033	0.469 ± 0.029	0.403 ± 0.032	0.443 ± 0.063
Pituitary (g)	0.020 ± 0.003	0.021 ± 0.003	0.020 ± 0.003	0.019 ± 0.002	0.018 ± 0.002	0.020 ± 0.002
(%)	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.000 *
Thyroid (g)	0.047 ± 0.013	0.045 ± 0.010	0.045 ± 0.008	0.040 ± 0.006	0.041 ± 0.011	0.044 ± 0.005
(%)	0.010 ± 0.003	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.002
Testes (g)	3.330 ± 0.243	3.432 ± 0.292	3.177 ± 0.391	3.306 ± 0.115	3.382 ± 0.204	2.701 ± 0.263 **
(%)	0.706 ± 0.029	0.728 ± 0.063	0.688 ± 0.079	0.740 ± 0.034	0.644 ± 0.061	0.577 ± 0.081
Epididymides (g)	1.331 ± 0.129	1.315 ± 0.070	1.260 ± 0.131	1.256 ± 0.098	1.331 ± 0.038	1.091 ± 0.179 *
(%)	0.282 ± 0.018	0.279 ± 0.027	0.273 ± 0.022	0.281 ± 0.028	0.254 ± 0.024	0.230 ± 0.018
Prostate, ventral lobe (g)	0.971 ± 0.219	0.970 ± 0.199	0.919 ± 0.234	0.867 ± 0.154	0.821 ± 0.131	0.807 ± 0.034
(%)	0.205 ± 0.039	0.206 ± 0.042	0.199 ± 0.049	0.194 ± 0.032	0.156 ± 0.027	0.172 ± 0.017
Seminal vesicles (g)	1.678 ± 0.191	1.831 ± 0.305	1.543 ± 0.383	1.641 ± 0.222	1.638 ± 0.374	1.290 ± 0.312
(%)	0.356 ± 0.045	0.390 ± 0.078	0.334 ± 0.084	0.368 ± 0.057	0.314 ± 0.088	0.271 ± 0.046

Data represent mean ± S.D.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 22 Organ weights of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		0	20	100	500
No. of animals examined		12	12	11	11
Body weight	(g)	299 ± 19	298 ± 16	295 ± 14	298 ± 20
Thymus	(g)	0.277 ± 0.067	0.280 ± 0.051	0.286 ± 0.044	0.282 ± 0.072
	(%)	0.093 ± 0.021	0.094 ± 0.017	0.097 ± 0.013	0.094 ± 0.021
Adrenals	(g)	0.097 ± 0.007	0.089 ± 0.012	0.089 ± 0.010	0.091 ± 0.009
	(%)	0.033 ± 0.003	0.030 ± 0.004	0.030 ± 0.004	0.031 ± 0.002
Heart	(g)	1.025 ± 0.071	1.004 ± 0.060	1.015 ± 0.048	1.078 ± 0.082
	(%)	0.344 ± 0.022	0.337 ± 0.017	0.344 ± 0.020	0.363 ± 0.024
Lungs	(g)	1.219 ± 0.078	1.209 ± 0.070	1.256 ± 0.102	1.254 ± 0.096
	(%)	0.409 ± 0.026	0.406 ± 0.025	0.426 ± 0.035	0.422 ± 0.035
Kidneys	(g)	1.943 ± 0.133	1.937 ± 0.171	1.940 ± 0.110	2.029 ± 0.224
	(%)	0.652 ± 0.041	0.649 ± 0.037	0.657 ± 0.023	0.683 ± 0.076
Spleen	(g)	0.685 ± 0.097	0.636 ± 0.091	0.647 ± 0.075	0.657 ± 0.080
	(%)	0.230 ± 0.035	0.213 ± 0.023	0.219 ± 0.024	0.221 ± 0.029
Liver	(g)	9.948 ± 1.096	9.647 ± 0.843	9.951 ± 0.556	10.032 ± 0.639
	(%)	3.332 ± 0.287	3.236 ± 0.229	3.375 ± 0.197	3.375 ± 0.167
Brain	(g)	1.969 ± 0.071	1.950 ± 0.072	1.915 ± 0.077	1.992 ± 0.074
	(%)	0.662 ± 0.052	0.656 ± 0.052	0.651 ± 0.050	0.672 ± 0.048
Pituitary	(g)	0.028 ± 0.005	0.025 ± 0.004	0.026 ± 0.003	0.027 ± 0.004
	(%)	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.002
Thyroid	(g)	0.036 ± 0.006	0.036 ± 0.006	0.035 ± 0.005	0.034 ± 0.009
	(%)	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.011 ± 0.003
Ovaries	(g)	0.146 ± 0.020	0.130 ± 0.029	0.142 ± 0.033	0.145 ± 0.022
	(%)	0.049 ± 0.007	0.044 ± 0.009	0.049 ± 0.012	0.049 ± 0.008
Uterus	(g)	0.692 ± 0.092	0.644 ± 0.063	0.657 ± 0.065	0.683 ± 0.073
	(%)	0.233 ± 0.041	0.216 ± 0.016	0.223 ± 0.021	0.231 ± 0.033

Data represent mean ± S.D.

Table 23 Organ weights of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		At the end of administration period		At the end of recovery period	
		0	500	0	500
No. of animals examined		5	5	5	4
Body weight	(g)	271 ± 8	246 ± 11 **	260 ± 8	269 ± 15
Thymus	(g)	0.344 ± 0.033	0.347 ± 0.100	0.255 ± 0.050	0.306 ± 0.039
	(%)	0.127 ± 0.011	0.140 ± 0.035	0.098 ± 0.019	0.114 ± 0.012
Adrenals	(g)	0.071 ± 0.009	0.077 ± 0.009	0.081 ± 0.013	0.094 ± 0.012
	(%)	0.026 ± 0.004	0.031 ± 0.003	0.031 ± 0.004	0.035 ± 0.003
Heart	(g)	0.935 ± 0.040	0.903 ± 0.080	0.909 ± 0.096	1.008 ± 0.070
	(%)	0.345 ± 0.018	0.367 ± 0.019	0.350 ± 0.039	0.377 ± 0.038
Lungs	(g)	1.089 ± 0.041	1.094 ± 0.055	1.049 ± 0.071	1.081 ± 0.076
	(%)	0.402 ± 0.021	0.445 ± 0.027 *	0.403 ± 0.025	0.403 ± 0.029
Kidneys	(g)	1.735 ± 0.131	1.825 ± 0.095	1.759 ± 0.122	2.206 ± 0.272 *
	(%)	0.639 ± 0.037	0.742 ± 0.029 **	0.677 ± 0.054	0.821 ± 0.092 *
Spleen	(g)	0.517 ± 0.053	0.480 ± 0.037	0.489 ± 0.043	0.536 ± 0.030
	(%)	0.190 ± 0.019	0.196 ± 0.018	0.188 ± 0.018	0.200 ± 0.016
Liver	(g)	6.878 ± 0.590	6.489 ± 0.489	6.397 ± 0.353	7.415 ± 0.591 *
	(%)	2.535 ± 0.182	2.637 ± 0.143	2.462 ± 0.183	2.762 ± 0.172 *
Brain	(g)	1.933 ± 0.065	1.948 ± 0.047	1.935 ± 0.074	1.936 ± 0.019
	(%)	0.713 ± 0.029	0.793 ± 0.036 **	0.744 ± 0.036	0.723 ± 0.043
Pituitary	(g)	0.025 ± 0.003	0.024 ± 0.002	0.024 ± 0.002	0.022 ± 0.003
	(%)	0.009 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.001
Thyroid	(g)	0.036 ± 0.006	0.037 ± 0.007	0.031 ± 0.003	0.034 ± 0.008
	(%)	0.013 ± 0.002	0.015 ± 0.003	0.012 ± 0.002	0.013 ± 0.002
Ovaries	(g)	0.103 ± 0.017	0.105 ± 0.025	0.095 ± 0.013	0.097 ± 0.009
	(%)	0.038 ± 0.007	0.043 ± 0.009	0.037 ± 0.005	0.036 ± 0.003
Uterus	(g)	0.594 ± 0.156	0.619 ± 0.231	0.714 ± 0.185	0.717 ± 0.272
	(%)	0.219 ± 0.057	0.250 ± 0.086	0.276 ± 0.078	0.268 ± 0.106

Data represent mean ± S.D.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 24 Histopathological findings of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		At the end of administration period				At the end of recovery period	
		0	20	100	500	0	500
No. of animals examined		<7>	<12>	<12>	<7>	<5>	<5>
(Kidney)	(Grade)						
regeneration: proximal tubule	+	0	1	0	0	0	0
eosinophilic body	+	1	0	0	0	1	0
(Testis)							
tubular atrophy	+	0	0	1	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	1
(Epididymis)							
spermatogenic granuloma	2+	0	0	1	0	0	0
(Prostate)							
inflammation	+	4	5	3	1	0	0
	2+	0	0	1	2	0	0
(Lung)							
accumulation of foamy cells	+	0	1	1	0	0	0
(Thyroid)							
ultimobranchial body remanet	+	1	3	2	1	1	0
(Pituitary)							
cyst	+	1	0	0	0	0	0
Rathke pouch	+	0	0	0	0	1	0

Grade: +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

Data represent the number of animals.

Table 25 Histopathological findings of female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		At the end of administration period				Dead 500	At the end of recovery period	
		0	20	100	500		0	500
No. of animals examined		<12/5> ¹⁾	<12>	<12>	<12/5> ¹⁾	<1> ²⁾	<5> ²⁾	<4> ²⁾
(Kidney)	(Grade)							
scar	+	1/0	0	0	0/0	0	0	0
regeneration: proximal tubule	+	0/0	0	1	1/0	0	0	2
(Heart)								
inflammatory cell nest	+	0/0	0	1	1/0	0	0	0
(Larynx)								
inflammation	2+	0/0	0	0	0/0	1	0	0
erosion	+	0/0	0	0	0/0	1	0	0
(Trachea)								
inflammation	3+	0/0	0	0	0/0	1	0	0
erosion	3+	0/0	0	0	0/0	1	0	0
(Lung)								
congestion	3+	0/0	0	0	0/0	1	0	0
edema	3+	0/0	0	0	0/0	1	0	0
hemorrhage	+	0/0	0	0	0/0	1	0	0
accumulation of foamy cells	+	2/1	1	0	1/0	0	0	0
(Liver)								
herniation	+	0/0	0	1	0/0	0	0	0
(Thyroid)								
ultimobranchial body remanet	+	0/0	0	2	1/2	1	1	1

Grade: +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

Data represent the number of animals.

¹⁾ mated females/satellite females²⁾ satellite females

Table 26 Estrous cycle and reproductive performance of rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
Estrous cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Normal ¹⁾	12	12	12	11
Abnormal ^{1), 3)}	0	0	0	1
Cycle (days) ²⁾	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.4
Reproductive performance				
No. of mated pairs	12	12	12	12
No. of copulated pairs	12	12	12	12
Copulation index (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation ²⁾	2.8 ± 0.9	2.6 ± 1.2	2.3 ± 1.2	2.6 ± 1.2
No. of pregnant females	12	12	11	11
Fertility index (%)	100.0	100.0	91.7	91.7
No. of females with complete parturition	12	12	11	11
Gestation index (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length (days) ²⁾	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	22.1 ± 0.3	22.0 ± 0.0
Findings in parturition ¹⁾				
No abnormalities detected	12	12	11	11
Findings in nursing ¹⁾				
No abnormalities detected	12	12	11	11

¹⁾ Data represent the number of animals.²⁾ Data represent mean ± S.D.³⁾ Continuous diestrus.

Copulation index = (No. of copulated pairs / No. of mated pairs) × 100.

Fertility index = (No. of pregnant females / No. of copulated pairs) × 100.

Gestation index = (No. of females with complete parturition / No. of pregnant females) × 100.

Table 27 Summary of implantation and development of pups from dams treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		20		100		500	
No. of corpora lutea	15.8 ± 0.7	(12)	14.6 ± 2.4	(12)	15.4 ± 1.3	(11)	15.3 ± 1.2	(11)
No. of implantations	15.8 ± 0.8	(12)	14.4 ± 2.4	(12)	15.1 ± 1.4	(11)	15.2 ± 1.2	(11)
Implantation index (%)	99.5 ± 1.8	(12)	98.9 ± 2.7	(12)	98.2 ± 3.2	(11)	99.4 ± 1.9	(11)
Postnatal day 0								
No. of pups born	14.7 ± 1.2	(12)	13.4 ± 2.4	(12)	13.9 ± 1.4	(11)	14.2 ± 1.1	(11)
No. of males per group	92	(12)	77	(12)	72	(11)	87	(11)
No. of females per group	84	(12)	84	(12)	81	(11)	69	(11)
Sex ratio of pups born	0.52 ± 0.15	(12)	0.48 ± 0.10	(12)	0.48 ± 0.14	(11)	0.56 ± 0.12	(11)
Delivery index (%)	93.1 ± 5.1	(12)	93.1 ± 6.3	(12)	92.4 ± 6.8	(11)	93.7 ± 7.0	(11)
No. of live pups	14.6 ± 1.2	(12)	13.4 ± 2.4	(12)	13.9 ± 1.4	(11)	14.2 ± 1.1	(11)
No. of males per group	92	(12)	77	(12)	72	(11)	87	(11)
No. of females per group	83	(12)	84	(12)	81	(11)	69	(11)
Sex ratio of live pups	0.52 ± 0.15	(12)	0.48 ± 0.10	(12)	0.48 ± 0.14	(11)	0.56 ± 0.12	(11)
Birth index (%)	92.6 ± 5.3	(12)	93.1 ± 6.3	(12)	92.4 ± 6.8	(11)	93.7 ± 7.0	(11)
Live birth index (%)	99.4 ± 1.9	(12)	100.0 ± 0.0	(12)	100.0 ± 0.0	(11)	100.0 ± 0.0	(11)
Pups weight (g)								
Male	6.9 ± 0.4	(12)	6.7 ± 0.4	(12)	6.8 ± 0.3	(11)	6.9 ± 0.7	(11)
Female	6.4 ± 0.4	(12)	6.3 ± 0.4	(12)	6.4 ± 0.3	(11)	6.4 ± 0.7	(11)
Postnatal day 4								
No. of live pups	14.6 ± 1.2	(12)	13.4 ± 2.4	(12)	13.5 ± 1.8	(11)	14.2 ± 1.1	(11)
No. of males per group	92	(12)	77	(12)	69	(11)	87	(11)
No. of females per group	83	(12)	84	(12)	80	(11)	69	(11)
Sex ratio of live pups	0.52 ± 0.15	(12)	0.48 ± 0.10	(12)	0.47 ± 0.13	(11)	0.56 ± 0.12	(11)
Viability index (%)	100.0 ± 0.0	(12)	100.0 ± 0.0	(12)	97.2 ± 5.4	(11)	100.0 ± 0.0	(11)
Pups weight (g)								
Male	10.8 ± 0.9	(12)	10.9 ± 0.6	(12)	10.8 ± 0.7	(11)	10.8 ± 1.0	(11)
Female	10.2 ± 0.8	(12)	10.3 ± 0.7	(12)	10.5 ± 0.8	(11)	10.1 ± 1.0	(11)

Data represent mean ± S.D.

Parentheses represent the number of litters examined.

Implantation index = (No. of implantations / No. of corpora lutea) × 100.

Sex ratio of pups born = No. of male pups born / No. of male and female pups born.

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

Sex ratio on day 0 = No. of male live pups on day 0 / No. of live pups on day 0.

Birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of implantations) × 100.

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

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

Sex ratio on day 4 = No. of male live pups on day 4 / No. of live pups on day 4.

Table 28 External abnormalities, general clinical observations and gross findings in necropsy of pups from dams treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
External abnormality				
No. of pups examined	175 (12)	161 (12)	153 (11)	156 (11)
Findings				
No abnormalities detected	175 (12)	161 (12)	153 (11)	156 (11)
General clinical observation				
No. of pups examined	175 (12)	161 (12)	153 (11)	156 (11)
Findings ¹⁾				
No abnormalities detected	175 (12)	161 (12)	149 (11)	156 (11)
Death	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
Cannibalized	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
Gross finding in necropsy				
No. of pups examined ²⁾	176 (12)	161 (12)	151 (11)	156 (11)
Findings				
No abnormalities detected	176 (12)	161 (12)	151 (11)	156 (11)

Parentheses represent the number of litters.

¹⁾ Except for external abnormalities.

²⁾ All necropsied pups including stillborn.

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸のラットを用いた
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：0765

FIGURES

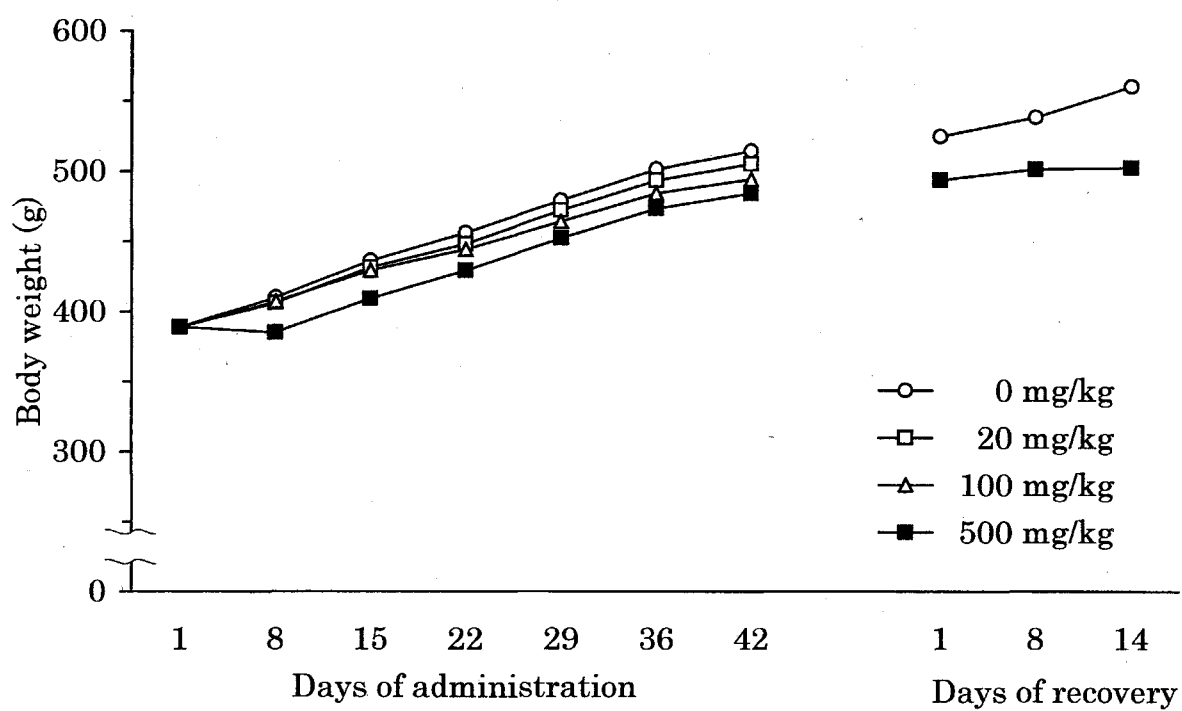


Figure 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

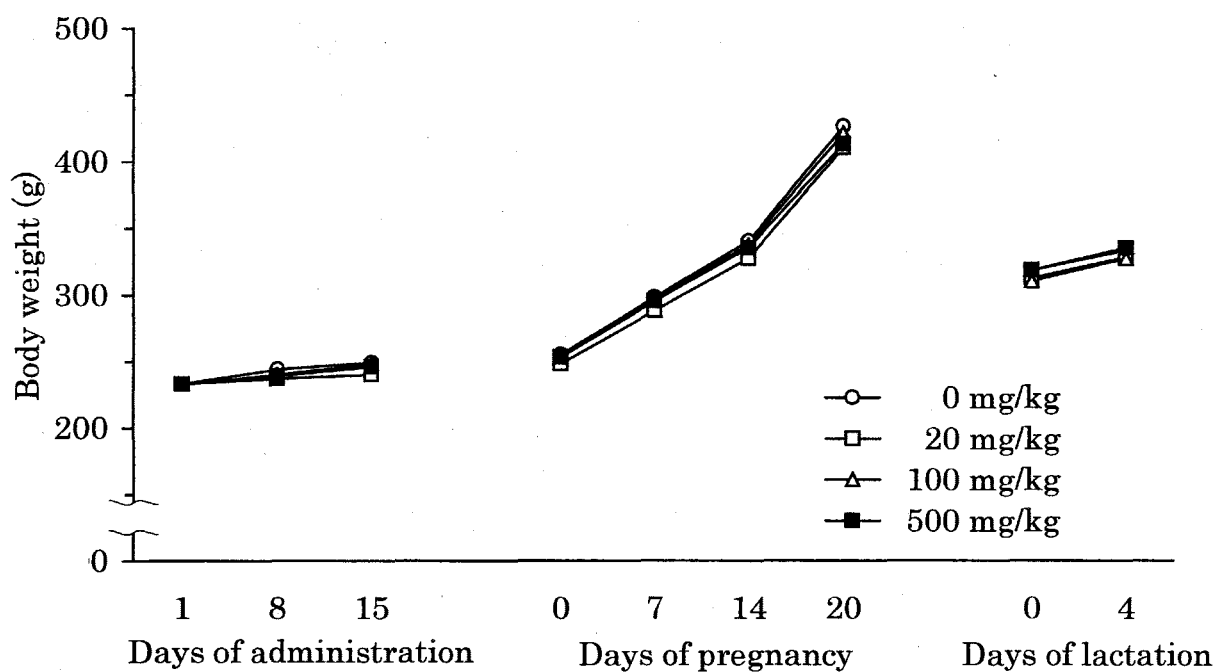


Figure 2 Body weight changes of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

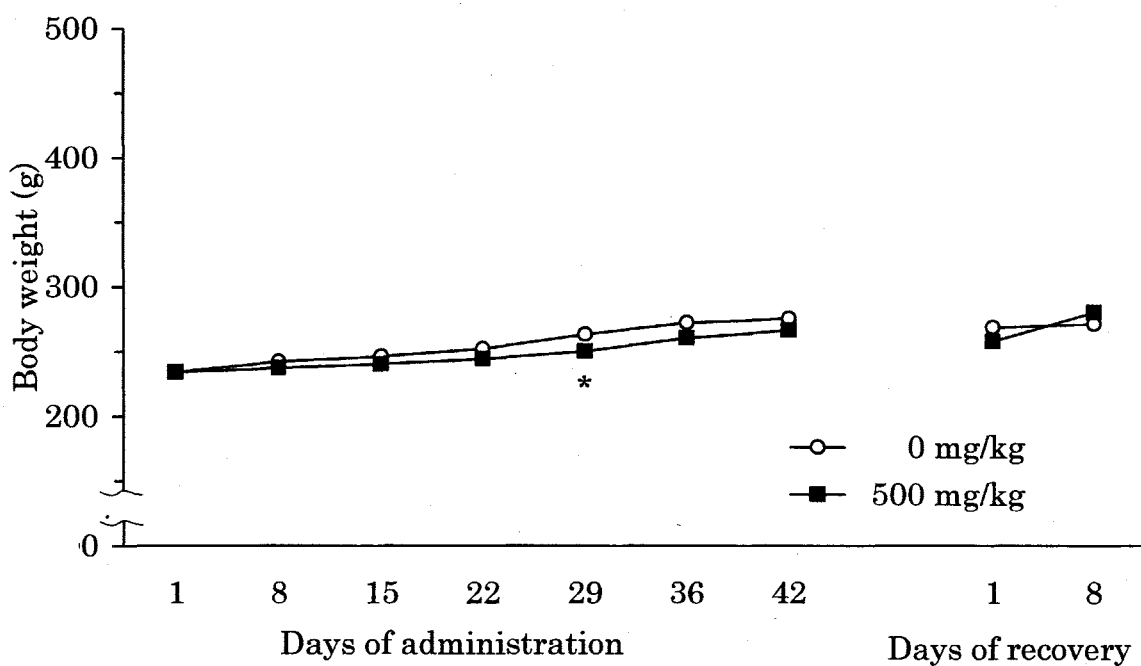


Figure 3 Body weight changes of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

* $p \leq 0.05$

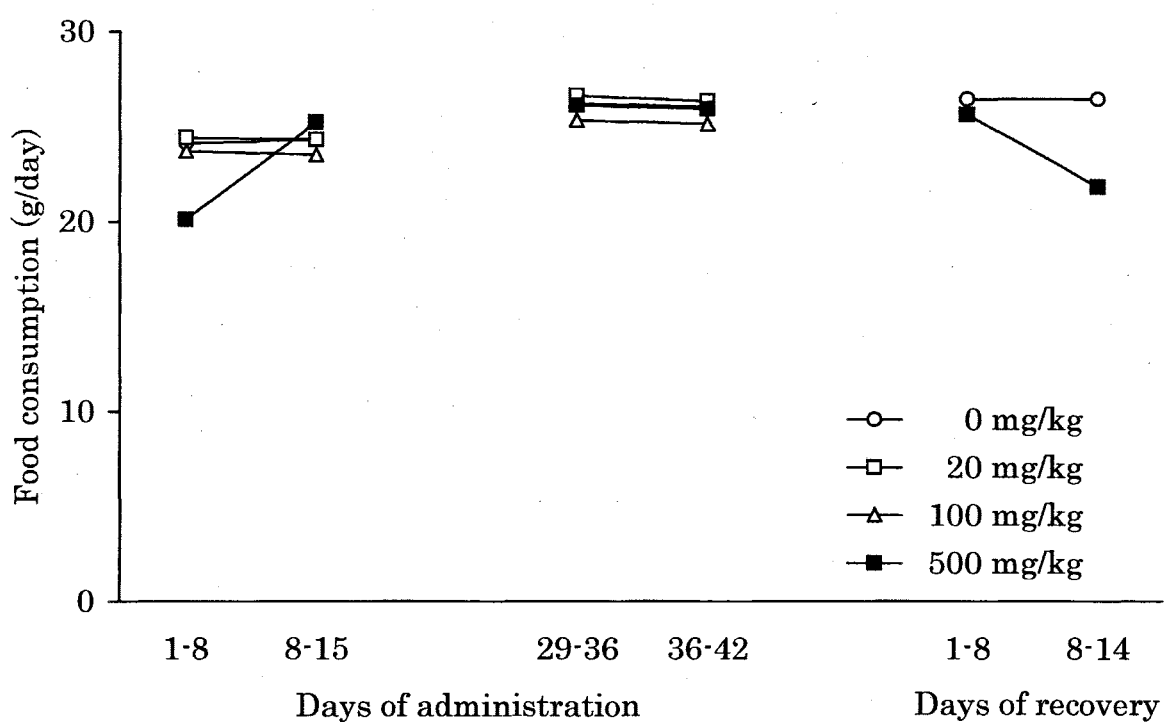


Figure 4 Food consumption changes of male rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

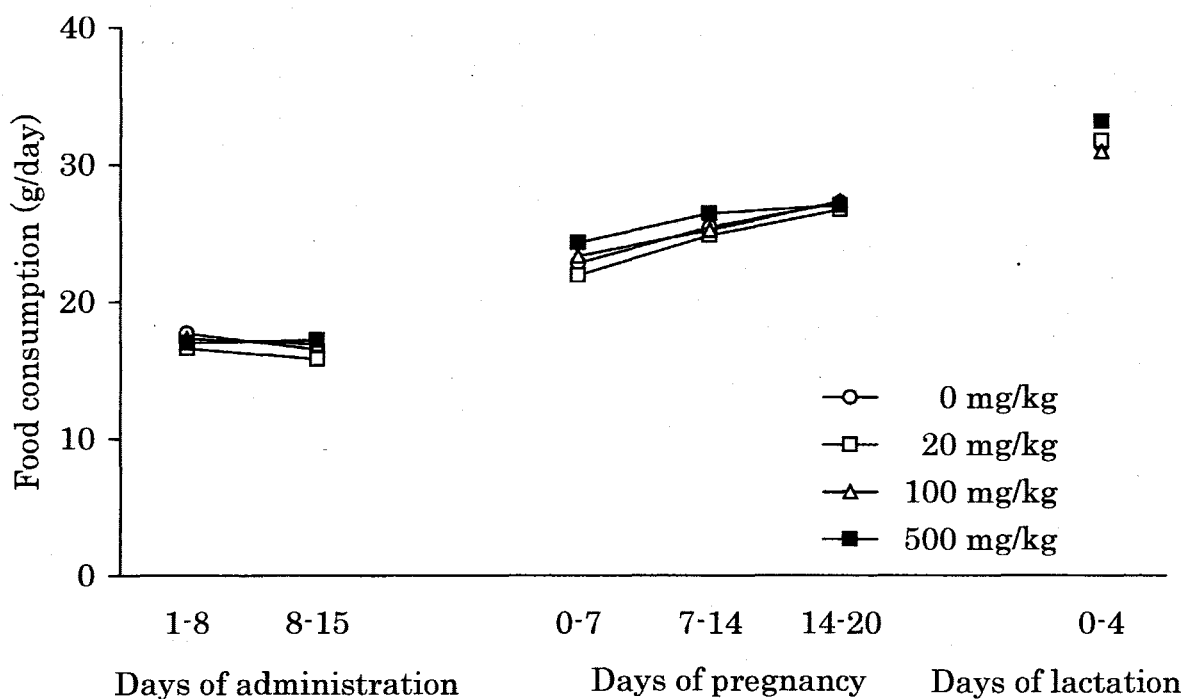


Figure 5 Food consumption changes of female rats (dams) treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

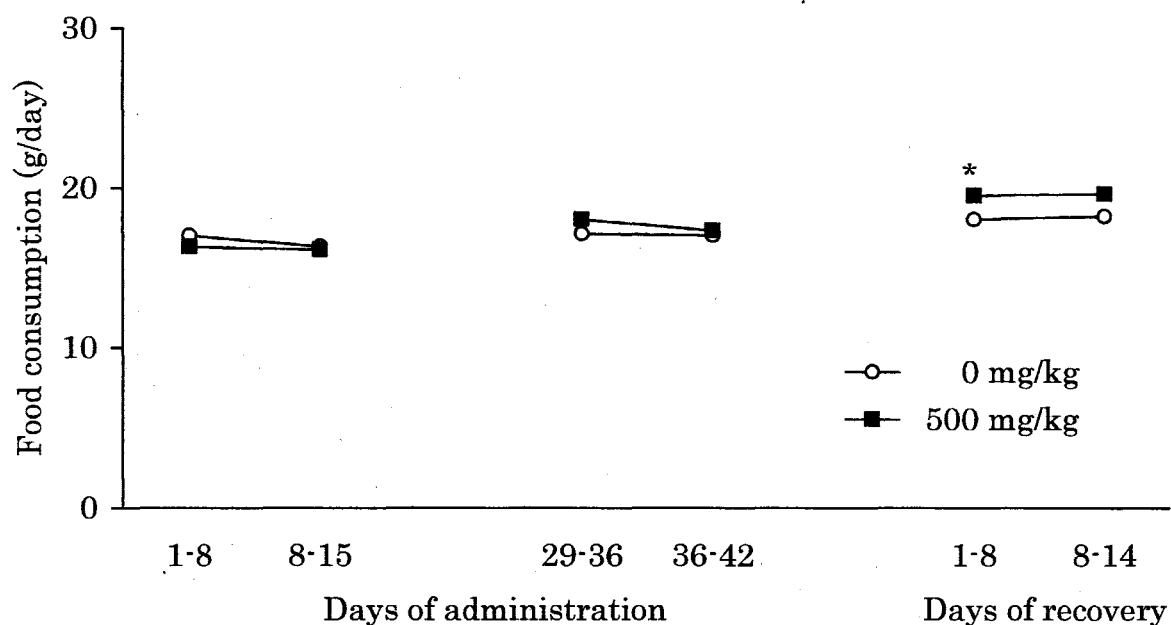


Figure 6 Food consumption changes of satellite female rats treated orally with 2,4-dimethylbenzenesulfonic acid in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

* $p \leq 0.05$