

## 2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

### Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 2-Amino-5-methylbenzenesulfonic acid in Rats

#### 要約

赤色顔料の合成原料に用いられている既存化学物質2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の28日間反復経口投与毒性試験を、SD系[Crj:CD(SD)]ラットを用い、0(対照)、100、300および1000 mg/kg用量の投与により実施した。動物数は1群雌雄各6匹とし、6群を設け、4群は投与期間終了後屠殺群、2群は対照および1000 mg/kgの14日間回復群とした。

動物の一般状態、体重および摂餌量においては、被験物質の投与による影響は認められなかった。尿検査および血液学検査では、尿比重の増加、尿pHの低下および主にリンパ球の減少による白血球数の減少が、1000 mg/kg群の雄に認められた。血液生化学検査では、いずれも1000 mg/kg群で、総コレステロールの減少が雄に、GPTの増加および血糖の減少が雌に認められた。剖検では、軽度な盲腸の拡張が、1000 mg/kg群の雌雄各1匹に認められた。器官重量および病理組織学検査においては、被験物質の投与に起因すると考えられる変化は、認められなかった。これら被験物質の投与による変化は、回復群においては認められず、可逆的であることが確認された。

以上の結果から、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットへの28日間反復経口投与により、軽度な臨床病理学的変化が認められた。無影響量は、雌雄とも300 mg/kg/dayと推定された。

#### 方法

##### 1. 被験物質

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸は、分子量187.22、融点300℃以上の水および有機溶媒に溶けにくい微黄白色の粉末で、赤色顔料の合成原料に用いられている。試験には、三星化学工業(株)製造のもの(ロット番号4231、純度99.96%)を入手し、冷暗(4℃)条件下で密栓保管し、使用した。投与液は、これを局方ゴマ油(宮澤薬品)に懸濁して調製し、使用時まで冷所遮光下で密栓保管した。被験物質の原体および投与液中の被験物質は、安定であることを確認した。

##### 2. 使用動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より搬入したSD系[Crj:CD(SD)]ラットを、雄は8日、雌は9日間検疫・馴化飼育し、5週齢(雄168-183 g、雌138-162 g)で、1群雌

雄各6匹として試験に用いた。ラットは、温度22±3℃、湿度55±10%、換気回数10回以上/時、照明12時間(6-18時)に設定した飼育室で、金網ケージに個別に収容し、固型飼料[日本農産工業(株)、ラボMRストック]および水を自由摂取させた。

##### 3. 投与量および投与方法

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットへの単回経口投与におけるLD<sub>50</sub>値は、12000 mg/kgと報告されている<sup>1)</sup>。投与量設定試験として、ラットを1群雌雄各4匹とし、0、100、250、500、1000および2000 mg/kg/day用量を14日間反復経口投与した。一般状態、体重、摂餌量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査および器官重量において、被験物質の毒性を示唆する変化は認められなかった。剖検においては、盲腸の拡張が2000 mg/kg群の雌雄全例に認められた。したがって、本試験における投与量は、1000 mg/kg/dayを高用量とし、以下300および100 mg/kg/dayの3用量および対照を設定した。試験群は、以上の4群の他に、1000 mg/kg/dayおよび対照の14日間回復群を設けた。投与は、胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を1日1回、28日間にわたって経口投与した。投与液量は、体重100 g当たり0.5 mlとした。対照群には局方ゴマ油を同様に投与した。

##### 4. 観察および検査項目

###### 1) 一般状態観察

投与および回復期間中毎日、生死および外観、行動等を観察した。

###### 2) 体重および摂餌量測定

体重は、投与1日(投与初日の投与直前)、3日およびその後は週2回、3あるいは4日ごと、ならびに屠殺日に測定した。摂餌量は、毎週1回(雄は投与5、12、19、26日および投与終了後5、12日、雌は投与4、11、16、23日および投与終了後4、11日)、翌日までの24時間の飼料消費量を測定した。

###### 3) 尿検査

雄は投与22日および投与終了後13日、雌は投与26あるいは27日および投与終了後12日にラットを代謝ケージに約3時間収容して採尿し、外観の観察、比重の測定(屈折計、エルマ光学)、pH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン[以上、マルテ

イステックス、マイルス・三共(株) および沈渣(URI-CEL液で染色, ケンブリッジケミカルプロダクト社)を検査した。

#### 4) 血液学検査

供試血液の採取は、投与期間および回復期間終了翌日における屠殺剖検時に行った。動物は採血前日の午後5時より除餌し、水のみを給与した。採取した血液は3分割し、その一部はEDTA-2Kで凝固防止処理し、多項目自動血球計数装置〔東亜医用電子(株), E-4000〕により、赤血球数(電気抵抗検出方式)、血色素量(ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(パルス検出方式)、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度(以上、計算値)、白血球数および血小板数(以上、電気抵抗検出方式)を、また塗抹標本を作製して網状赤血球数(Brilliant cresyl blue染色)および白血球百分率(May-Giemsa染色)を測定した。さらに一部は3.8%クエン酸ナトリウム液で処理して血漿を得、血液凝固自動測定装置(アメルング社, KC-10A)により、プロトロンビン時間(Quick一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸活性化法)を測定した。

#### 5) 血液生化学検査

採取した血液の一部から血清を分離し、生化学自動分析装置〔日本電子(株), JCA-VX-1000型クリナライザー〕により、総タンパク(Biuret法)、アルブミン(BCG)、A/G比(計算値)、血糖、トリグリセライド、総コレステロール(以上、酵素法)、総ビリルビン(Jendrassik法)、尿素窒素(Urease-UV法)、クレアチニン(Jaffé法)、GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP(以上、SSCC法)、アルカリホスファターゼ(GSCC法)、カルシウム(OCPC法)および無機リン(酵素法)を、電解質自動分析装置〔東亜電波工業(株), NAKL-1〕により、ナトリウム、カリウムおよび塩素を測定した。

#### 6) 病理学検査

採血に続いて剖検し、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、精巣上部、卵巣を秤量した。病理組織学検査は、採取した器官を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、対照群および1000 mg/kg群では脳、下垂体、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、胸腺、心臓、気管、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、小腸(十二指腸・空腸・回腸)、大腸(盲腸・結腸・直腸)、脾臓、精巣、精巣上部、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膣、膀胱、リンパ節(頸部リンパ節・腸間膜リンパ節)、脊髄(頸膨大部・腰膨大部)、坐骨神経、骨髄を検査した。また、100 mg/kg群の雌で胸腺重量に変化が認められたので、雌の胸腺については、100および300 mg/kg群も検査した。検査は、常法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。

#### 5. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、Dunnettの多重比較検定を行った。ただし、回復群については、t検定およびU検定を行った。

### 結果

#### 1. 一般状態および死亡

各群の雌雄とも、投与および回復期間を通じて、一般状態の変化および死亡は認められなかった。

#### 2. 体重(Fig. 1)

被験物質投与各群の体重は、雌雄とも対照群と類似した推移を示し、体重増加量においても、対照群と比べ、有意な差は認められなかった。

#### 3. 摂餌量

被験物質投与各群の摂餌量は、雌雄とも対照群に比べ、有意な差は認められなかった。

#### 4. 尿所見(Table 1, 2)

有意な比重の増加およびpHの低下が、1000 mg/kg群の雄に認められた。1000 mg/kg群の回復群においては、各検査項目に有意な変化は認められなかった。

#### 5. 血液学所見(Table 3, 4)

白血球数の有意な減少が、1000 mg/kg群の雄に認められた。白血球数の減少は、白血球百分率からみて、主にリンパ球の減少によるものであった。1000 mg/kg群の回復群においては、白血球数に有意な変化は認められなかった。

#### 6. 血液生化学所見(Table 5, 6)

いずれも1000 mg/kg群で、総コレステロールの有意な減少が雄に、GPTの有意な増加が雌に認められた。さらに、血糖の有意な減少が100および1000 mg/kg群の雌に認められた。血糖の減少は300 mg/kg群では認められず、用量相関性に欠ける所見であったが、1000 mg/kg群の値は対照群と比べ明らかに低値であった。1000 mg/kgの回復群においては、このような変化は認められず、いずれも回復していた。投与期間終了後の検査で認められた変化とは別の検査項目に有意な変化が認められたが、当研究所の背景データからみて、正常範囲内の軽度な変動であった。

#### 7. 剖検所見

盲腸の内容物貯留による軽度な拡張が、1000 mg/kg群の雌雄各1匹に認められた。1000 mg/kgの回復群には、盲腸に変化は認められなかった。

#### 8. 器官重量(Table 7, 8)

胸腺の絶対および相対重量の有意な減少が100 mg/kg群の雌に、脾臓の相対重量のみの有意な増加が被験物質

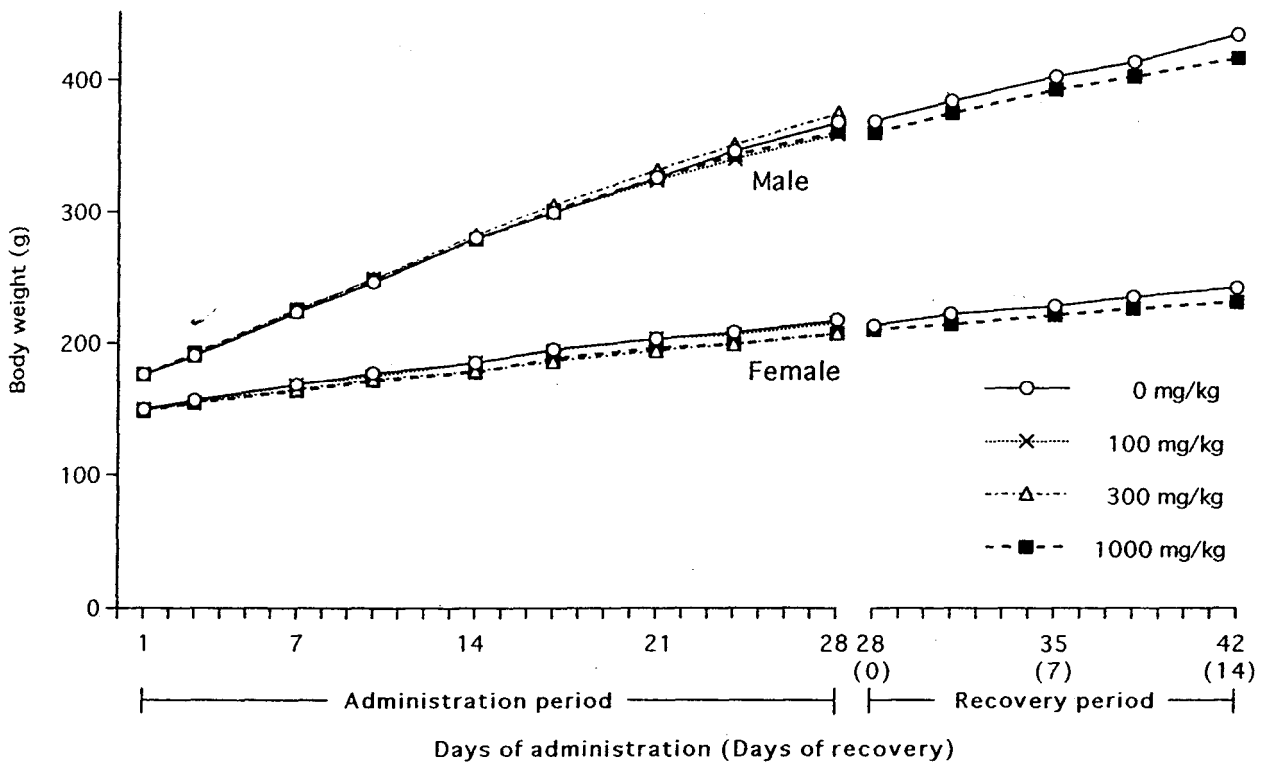


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

投与各群の雌に認められたが、両器官とも用量相関的な変化ではなかった。

#### 9. 病理組織学所見

被験物質の投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。肺、肝臓、脾臓、腎臓および前立腺に軽度な変化が対照群および1000 mg/kg群に認められたが、散発的、かつ、用量相関性が認められず、偶発的な変化と判断される所見であった。

#### 考察

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の類縁化合物のラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験で、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は明らかな毒性影響を示さず<sup>2)</sup>、3-アミノベンゼンスルホン酸は1000 mg/kgで軽度な尿性状の変化が認められた<sup>3)</sup>、と報告されている。

今回実施した2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の28日間反復経口投与毒性試験においては、動物の一般状態、体重および摂餌量において、被験物質の投与による影響は認められなかった。

尿検査、血液学検査、血液生化学検査においては、いずれも1000 mg/kg群で、尿比重の増加、尿pHの低下、白血球数および総コレステロールの減少が雄に、GPTの増加、血糖の減少が雌に認められた。

尿比重の変化は、腎臓における尿の濃縮機能の障害がうたがわれる減少性の変化ではなく、尿pHの低下につ

いても、アシドーシスの徴候が認められないことから、おそらく被験物質が酸性物質であることによる単純な変化と考えられる。いずれにしても、他の検査において、これらの尿所見と関連する変化は認められず、毒性学的意義は小さいものと判断される。

白血球数の減少については、主にリンパ球の減少によるものであった。用量相関的な変化ではなかったが、100 mg/kg群の雌で胸腺重量の減少が認められ、リンパ系組織に対し何らかの影響を有する可能性も考えられた。しかし、骨髓造血細胞および胸腺、リンパ節、脾臓等のリンパ系組織には病理組織学的に異常は認められなかった。また、白血球数の減少の程度も、軽度なものであった。

血液生化学的影響については、主に肝機能に対する影響がうたがわれる所見であった。しかし、肝臓を含む全身諸器官に、被験物質の投与に起因する病理組織学的な変化は認められなかった。また血液生化学的变化の程度も、軽度なものであった。

剖検で、盲腸の拡張が1000 mg/kg群に認められた。この盲腸の拡張は、軽度、かつ、雌雄各1匹の発現であったが、投与量設定試験において、2000 mg/kg群の雌雄全例に認められていることから、被験物質の投与に起因するものと判断された。

盲腸の拡張は、げっ歯類への抗菌性物質投与時に一般的に認められ、腸内細菌叢の変化によるものと考えられている<sup>4)</sup>。本試験で認められた盲腸の拡張の発現機序は不明であるが、下痢などの消化管症状や発育に対する影響を伴っておらず、生体に対する影響としては軽度なも

Table 1 Urinary examination of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	Color			Cloudy		Specific gravity	pH					Protein			Glucose			Ketone body			Occult blood			Urobilinogen	
			C	PY	Y	PB	-		+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+++	-	±	-	±	+++	-	±	+	0.1
Administration period	0	12	8	4		8	4	1.037 ± 0.014 <sup>a)</sup>	3	3	6			3	8	1	12			3	7	2	8	4	12		
	100	6	3	3		3	3	1.044 ± 0.014	3	1	1	1		1	4	1	6			2	2	2	6		6		
	300	6		6		2	4	1.046 ± 0.017	1	2	1	2		1	4	1	6			1	2	3	5	1	6		
	1000	12	7	4	1	7	5	1.057 ± 0.019 <sup>*</sup>	2	4	4	1	1 <sup>**</sup>		9	3	12			8	1	3	9	3	12		
Recovery period	0	6	2	3	1	2	4	1.045 ± 0.015	1	1	2	2		1	4	1	6			4	2		6		6		
	1000	6	1	5		4	2	1.047 ± 0.006	1	2	3			5	1	6			3	3		6		6			

a) : Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group (\*:p<0.05;\*\* :p<0.01)  
 Color: C(colorless), PY (pale yellow), Y (yellow), PB (pale brown); Cloudy: - (negligible), + (cloudy); Protein: - (negligible), ± (15-30 mg/dl), + (30 mg/dl), ++ (100 mg/dl); Glucose: - (negligible), ± (0.1 g/dl); Ketone body: - (negligible), ± (5 mg/dl), + (15 mg/dl), ++ (40 mg/dl); Occult blood: - (negligible), ± (trace), + (slight); Urobilinogen: Ehrlich unit/dl; Bilirubin: - (negligible), + (slight)  
 b) : - (not observed), + (a few in some fields), ++ (a few in all fields), +++ (many in all fields)  
 Crystal: Mg (ammonium magnesium phosphate), Ca (calcium phosphate), Ams (amorphous); Epithelial cells: Sq (squamous), R (round), S (spindle); Casts: G (granule), H (hyaline), W (waxy)

Table 2 Urinary examination of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	Color			Cloudy		Specific gravity	pH					Protein			Glucose			Ketone body			Occult blood			Urobilinogen	
			C	PY	Y	PB	-		+	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+++	-	±	-	±	+++	-	±	+
Administration period	0	12	5	5	2	4	8	1.067 ± 0.019 <sup>a)</sup>	4	2	1	1	4		3	8	1	12			5	7		10	2	12	
	100	6	4	1	1	4	2	1.068 ± 0.008	2	3	1			1	2	3	6			1	5		6		6		
	300	6	3	3		3	3	1.059 ± 0.018	3	2	1			2	3	1	6			3	3		6		6		
	1000	12	5	7		10	2	1.074 ± 0.029	3	5	2		2	1	1	4	6	12			8	4		12		12	
Recovery period	0	6	1	2	3	6		1.068 ± 0.025	2	2	1	1		1	4	1	6			5	1		6		6		
	1000	6	1	4	1	5	1	1.056 ± 0.016	3	1	1	1		2	3	1	6			5	1		6		6		

a) : Mean ± S.D.  
 Color: C(colorless), PY (pale yellow), Y (yellow), PB (pale brown); Cloudy: - (negligible), + (cloudy); Protein: - (negligible), ± (15-30 mg/dl), + (30 mg/dl), ++ (100 mg/dl); Glucose: - (negligible), ± (0.1 g/dl); Ketone body: - (negligible), ± (5 mg/dl), + (15 mg/dl), ++ (40 mg/dl); Occult blood: - (negligible), ± (trace), + (slight); Urobilinogen: Ehrlich unit/dl; Bilirubin: - (negligible), + (slight)  
 b) : - (not observed), + (a few in some fields), ++ (a few in all fields), +++ (many in all fields)  
 Crystal: Mg (ammonium magnesium phosphate), Ca (calcium phosphate), Ams (amorphous); Epithelial cells: Sq (squamous), R (round), S (spindle); Casts: G (granule), H (hyaline), W (waxy)

Table 3 Hematological examination of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Erythrocyte ( $10^4/\text{mm}^3$ )	761 ± 29	775 ± 35	755 ± 36	787 ± 35	817 ± 30	829 ± 26
Hematocrit (%)	45.0 ± 0.9	44.8 ± 1.3	44.3 ± 1.7	45.5 ± 1.9	45.6 ± 1.4	44.6 ± 1.3
Hemoglobin (g/dl)	15.4 ± 0.3	15.6 ± 0.4	15.4 ± 0.4	15.6 ± 0.6	15.5 ± 0.5	15.3 ± 0.6
Reticulocyte (%)	42 ± 15	29 ± 4	35 ± 7	29 ± 9	31 ± 5	34 ± 5
Leukocyte ( $10^2/\text{mm}^3$ )	76 ± 16	67 ± 9	73 ± 26	49 ± 11*	88 ± 28	85 ± 17
Differential count (%)						
Lymphocyte	89 ± 2	85 ± 4	84 ± 7	82 ± 3	91 ± 3	89 ± 1
Neutrophil band segmented	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Eosinophil	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	1 ± 1
Basophil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Monocyte	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1
Platelet ( $10^4/\text{mm}^3$ )	154 ± 21	140 ± 14	158 ± 16	149 ± 12	141 ± 16	146 ± 9
PT (sec)	12.7 ± 0.4	13.1 ± 0.4	12.9 ± 0.3	13.1 ± 0.2	12.6 ± 0.3	12.6 ± 0.3
APTT (sec)	16.8 ± 0.9	17.1 ± 0.9	17.0 ± 0.9	17.8 ± 0.8	18.5 ± 1.0	18.6 ± 1.1

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (\*:  $p < 0.05$ )

Table 4 Hematological examination of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Erythrocyte ( $10^4/\text{mm}^3$ )	766 ± 29	769 ± 34	775 ± 42	772 ± 25	819 ± 30	803 ± 1
Hematocrit (%)	43.1 ± 0.4	43.1 ± 1.2	43.4 ± 1.8	43.7 ± 0.9	44.7 ± 1.7	43.6 ± 0.9
Hemoglobin (g/dl)	15.0 ± 0.2	15.1 ± 0.6	15.2 ± 0.7	15.4 ± 0.3	15.4 ± 0.6	15.2 ± 0.4
Reticulocyte (%)	26 ± 7	28 ± 7	26 ± 6	24 ± 7	32 ± 7	28 ± 8
Leukocyte ( $10^2/\text{mm}^3$ )	41 ± 7	39 ± 13	49 ± 19	43 ± 7	45 ± 21	51 ± 18
Differential count (%)						
Lymphocyte	88 ± 6	88 ± 3	88 ± 5	86 ± 3	88 ± 5	86 ± 7
Neutrophil band segmented	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Eosinophil	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 2	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 1
Basophil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Monocyte	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 0
Platelet ( $10^4/\text{mm}^3$ )	145 ± 17	140 ± 17	136 ± 13	138 ± 5	146 ± 12	140 ± 21
PT (sec)	12.8 ± 0.5	13.0 ± 0.4	12.9 ± 0.2	13.0 ± 0.4	13.0 ± 0.3	13.2 ± 0.3
APTT (sec)	16.0 ± 0.8	16.5 ± 0.6	16.5 ± 1.0	16.8 ± 1.0	16.5 ± 0.4	17.0 ± 0.7

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 5 Blood chemical examination of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
No. of animals	6	6	6	6	6	6
GOT(IU/l)	61 ± 6	59 ± 6	63 ± 5	59 ± 2	58 ± 9	61 ± 6
GPT(IU/l)	32 ± 6	27 ± 3	31 ± 3	30 ± 6	26 ± 5	33 ± 6
γ-GTP(IU/l)	0.19 ± 0.12	0.24 ± 0.15	0.35 ± 0.14	0.36 ± 0.21	0.29 ± 0.31	0.28 ± 0.19
ALP(IU/l)	428 ± 50	399 ± 70	506 ± 77	441 ± 77	270 ± 32	332 ± 57*
T.protein(g/dl)	6.03 ± 0.12	6.10 ± 0.22	6.30 ± 0.22	6.14 ± 0.09	6.34 ± 0.15	6.32 ± 0.20
Albumin(g/dl)	2.96 ± 0.16	3.05 ± 0.12	3.04 ± 0.13	2.99 ± 0.12	2.98 ± 0.09	2.95 ± 0.15
A/G ratio	0.97 ± 0.09	1.00 ± 0.04	0.93 ± 0.07	0.95 ± 0.07	0.89 ± 0.06	0.88 ± 0.09
T.cholesterol(mg/dl)	90 ± 10	77 ± 9	85 ± 9	74 ± 10*	101 ± 14	91 ± 10
Triglyceride(mg/dl)	83 ± 44	80 ± 29	87 ± 28	50 ± 15	125 ± 36	76 ± 33*
Glucose(mg/dl)	138 ± 11	145 ± 11	148 ± 16	137 ± 10	174 ± 19	161 ± 17
T.bilirubin(mg/dl)	0.34 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.02
Urea nitrogen(mg/dl)	15.1 ± 1.9	14.7 ± 1.8	15.9 ± 2.2	14.9 ± 1.3	17.1 ± 2.0	18.0 ± 1.4
Creatinine(mg/dl)	0.51 ± 0.02	0.52 ± 0.04	0.56 ± 0.06	0.52 ± 0.04	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.09
Ca(mg/dl)	10.0 ± 0.5	10.1 ± 0.3	10.0 ± 0.2	9.8 ± 0.2	10.1 ± 0.3	9.9 ± 0.3
I.phosphorus(mg/dl)	7.7 ± 0.8	7.5 ± 0.7	7.5 ± 0.3	7.3 ± 0.3	8.0 ± 0.9	7.6 ± 0.3
Na(mEq/l)	141 ± 1	143 ± 0	142 ± 1	142 ± 1	141 ± 1	141 ± 1
K(mEq/l)	4.73 ± 0.13	4.39 ± 0.27	4.65 ± 0.31	4.58 ± 0.13	4.53 ± 0.35	4.41 ± 0.19
Cl(mEq/l)	103 ± 1	104 ± 1	104 ± 2	105 ± 1	104 ± 2	105 ± 1

Vales are expressed as Mean ± S.D.  
Significantly different from control group (\*:p<0.05)

Table 6 Blood chemical examination of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
No. of animals	6	6	6	6	6	6
GOT (IU/l)	57 ± 7	60 ± 4	62 ± 5	66 ± 10	65 ± 9	65 ± 12
GPT (IU/l)	24 ± 4	27 ± 2	24 ± 5	32 ± 5**	25 ± 4	26 ± 6
γ-GTP (IU/l)	0.41 ± 0.27	0.20 ± 0.14	0.25 ± 0.19	0.33 ± 0.28	0.46 ± 0.43	0.31 ± 0.28
ALP (IU/l)	237 ± 82	280 ± 50	271 ± 53	225 ± 62	202 ± 30	189 ± 36
T.protein (g/dl)	6.47 ± 0.29	6.31 ± 0.19	6.31 ± 0.20	6.51 ± 0.18	6.59 ± 0.25	6.65 ± 0.23
Albumin (g/dl)	3.27 ± 0.27	3.23 ± 0.13	3.22 ± 0.14	3.19 ± 0.11	3.39 ± 0.27	3.36 ± 0.30
A/G ratio	1.02 ± 0.10	1.05 ± 0.05	1.05 ± 0.06	0.96 ± 0.08	1.07 ± 0.15	1.03 ± 0.13
T.cholesterol (mg/dl)	101 ± 20	80 ± 9	84 ± 14	86 ± 24	111 ± 19	92 ± 18
Triglyceride (mg/dl)	51 ± 37	43 ± 11	59 ± 24	36 ± 12	51 ± 24	52 ± 15
Glucose (mg/dl)	138 ± 6	121 ± 14*	126 ± 11	116 ± 9**	137 ± 15	130 ± 11
T.bilirubin (mg/dl)	0.24 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.24 ± 0.03*
Urea nitrogen (mg/dl)	17.0 ± 1.6	19.0 ± 2.7	17.3 ± 1.4	17.4 ± 2.6	20.5 ± 1.7	20.8 ± 1.4
Creatinine (mg/dl)	0.58 ± 0.05	0.57 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.56 ± 0.04	0.64 ± 0.06	0.62 ± 0.07
Ca (mg/dl)	10.2 ± 0.4	10.1 ± 0.2	9.9 ± 0.2	10.1 ± 0.3	10.0 ± 0.4	10.2 ± 0.1
I.phosphorus (mg/dl)	6.6 ± 0.7	6.6 ± 0.6	6.0 ± 0.4	6.3 ± 0.6	6.0 ± 0.9	5.8 ± 0.8
Na (mEq/l)	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 0	142 ± 1	142 ± 1
K (mEq/l)	4.27 ± 0.26	4.30 ± 0.23	4.38 ± 0.31	4.33 ± 0.19	4.39 ± 0.11	4.31 ± 0.25
Cl (mEq/l)	107 ± 2	107 ± 2	108 ± 1	108 ± 2	107 ± 2	107 ± 2

Vales are expressed as Mean ± S.D.  
Significantly different from control group (\*:p<0.05; \*\*:p<0.01)

Table 7 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
No. of animals	6	6	6	6	6	5
Body weight (g)	340 ± 18	333 ± 14	346 ± 13	335 ± 26	399 ± 41	386 ± 22
Absolute weight						
Brain (g)	1.98 ± 0.08	2.00 ± 0.08	1.96 ± 0.07	2.02 ± 0.08	2.05 ± 0.10	2.01 ± 0.09
Liver (g)	10.44 ± 1.11	10.23 ± 0.88	10.95 ± 0.76	9.89 ± 1.51	12.01 ± 1.71	11.42 ± 1.11
Kidneys (g)	2.48 ± 0.14	2.36 ± 0.11	2.58 ± 0.25	2.51 ± 0.31	2.66 ± 0.29	2.67 ± 0.34
Spleen (g)	0.69 ± 0.09	0.65 ± 0.10	0.67 ± 0.04	0.65 ± 0.12	0.71 ± 0.08	0.76 ± 0.11
Heart (g)	1.21 ± 0.08	1.12 ± 0.11	1.21 ± 0.08	1.12 ± 0.10	1.41 ± 0.17	1.24 ± 0.09
Thymus (g)	0.61 ± 0.07	0.51 ± 0.07	0.64 ± 0.12	0.57 ± 0.14	0.49 ± 0.08	0.47 ± 0.04
Adrenals (mg)	53.7 ± 7.1	53.5 ± 2.8	53.5 ± 5.8	56.8 ± 8.9	57.6 ± 6.7	51.1 ± 7.1
Testes (g)	3.03 ± 0.18	3.27 ± 0.32	3.22 ± 0.20	3.23 ± 0.21	3.22 ± 0.18	3.11 ± 0.41
Epididymides (g)	0.87 ± 0.15	0.90 ± 0.13	0.87 ± 0.14	0.87 ± 0.10	1.11 ± 0.09	1.08 ± 0.18
Relative weight						
Brain (g%)	0.58 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.61 ± 0.05	0.52 ± 0.04	0.52 ± 0.04
Liver (g%)	3.06 ± 0.18	3.07 ± 0.15	3.17 ± 0.20	2.94 ± 0.24	3.00 ± 0.15	2.95 ± 0.18
Kidneys (g%)	0.73 ± 0.04	0.71 ± 0.01	0.75 ± 0.06	0.75 ± 0.07	0.67 ± 0.02	0.69 ± 0.07
Spleen (g%)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.03
Heart (g%)	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.36 ± 0.07	0.32 ± 0.02
Thymus (g%)	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.02
Adrenals (mg%)	15.79 ± 1.90	16.08 ± 1.03	15.54 ± 2.07	17.03 ± 2.71	14.50 ± 1.50	13.28 ± 1.93
Testes (g%)	0.89 ± 0.08	0.98 ± 0.11	0.93 ± 0.07	0.97 ± 0.10	0.82 ± 0.10	0.81 ± 0.10
Epididymides (g%)	0.26 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.28 ± 0.05

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 8 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
No. of animals	6	6	6	6	6	5
Body weight (g)	205 ± 16	200 ± 16	192 ± 13	191 ± 15	218 ± 15	214 ± 16
Absolute weight						
Brain (g)	1.78 ± 0.08	1.84 ± 0.09	1.85 ± 0.07	1.80 ± 0.03	1.82 ± 0.10	1.86 ± 0.07
Liver (g)	6.33 ± 0.89	5.86 ± 0.50	5.75 ± 0.57	5.49 ± 0.73	5.98 ± 0.60	5.91 ± 0.55
Kidneys (g)	1.55 ± 0.12	1.49 ± 0.21	1.50 ± 0.14	1.52 ± 0.17	1.58 ± 0.13	1.51 ± 0.06
Spleen (g)	0.40 ± 0.06	0.43 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.43 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.47 ± 0.04
Heart (g)	0.80 ± 0.05	0.75 ± 0.05	0.74 ± 0.05	0.75 ± 0.10	0.80 ± 0.07	0.79 ± 0.04
Thymus (g)	0.50 ± 0.08	0.37 ± 0.05*	0.47 ± 0.09	0.43 ± 0.04	0.37 ± 0.10	0.33 ± 0.06
Adrenals (mg)	57.3 ± 7.0	60.2 ± 10.8	64.7 ± 11.5	55.2 ± 8.3	56.1 ± 5.7	58.2 ± 6.6
Ovaries (g)	78.6 ± 5.4	77.1 ± 11.1	83.8 ± 10.5	83.8 ± 20.2	78.0 ± 13.7	78.2 ± 14.6
Relative weight						
Brain (g%)	0.88 ± 0.06	0.92 ± 0.08	0.96 ± 0.05	0.95 ± 0.08	0.83 ± 0.04	0.88 ± 0.06
Liver (g%)	3.09 ± 0.25	2.94 ± 0.15	2.99 ± 0.14	2.86 ± 0.19	2.74 ± 0.25	2.77 ± 0.05
Kidneys (g%)	0.76 ± 0.04	0.74 ± 0.06	0.78 ± 0.06	0.80 ± 0.04	0.72 ± 0.06	0.71 ± 0.07
Spleen (g%)	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.02*	0.23 ± 0.01**	0.22 ± 0.01**	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.02
Heart (g%)	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.37 ± 0.02
Thymus (g%)	0.24 ± 0.02	0.19 ± 0.02**	0.24 ± 0.04	0.23 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.02
Adrenals (mg%)	28.00 ± 2.67	29.95 ± 3.39	33.70 ± 5.51	28.82 ± 3.76	25.64 ± 1.46	27.24 ± 2.32
Ovaries (g%)	38.4 ± 1.4	38.8 ± 6.2	43.6 ± 2.6	43.8 ± 9.8	35.6 ± 5.3	36.9 ± 7.9

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

のと考えられる。

このような、投与期間終了後屠殺動物で認められた変化は、回復期間終了後屠殺動物には認められず、可逆的な変化であることが確認された。

以上の結果から、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットへの28日間反復投与により、主な毒性影響として、いずれも軽度な白血球数の減少および主に肝機能に対する影響が示唆される血液生化学的变化が発現し、尿性状および盲腸に対する影響も認められた。無影響量は、300 mg/kg/dayと推定された。

### 文献

- 1) Registry of toxic effects of chemical substances, 1981-1982.
- 2) 井上博之, 化学物質毒性試験報告, 1, 339 (1994).
- 3) 釜田悟, 化学物質毒性試験報告, 2, 379 (1995).
- 4) 小野寺威, “毒性試験法講座15-医薬品,” 福田英臣, 秋本健, 坂口孝編, 地人書館, 東京, 1990, pp.37-38.

### 連絡先

試験責任者: 伊藤義彦

試験担当者: 山本譲, 下平裕二, 赤木博,  
福田苗美, 藩栗緒

(財)畜産生物科学安全研究所

〒229-11 神奈川県相模原市橋本台3-7-11

Tel 0427-62-2775 Fax 0427-62-7979

### Correspondence

Authors: Yoshihiko Ito (Study director)

Yuzuru Yamamoto, Yuuji Shimodaira,

Hiroshi Akagi, Naemi Fukuda, Cleo Pan

Research Institute for Animal Science in

Biochemistry and Toxicology

3-7-11 Hashimotodai, Sagamihara-shi, Kanagawa,

229-11, Japan

Tel +81-427-62-2775 Fax +81-427-62-7979



## 2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

### Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test of 2-Amino-5-methylbenzenesulfonic acid by Oral Administration in Rats

#### 要約

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の100, 300および1000 mg/kgをSD系(Crj:CD(SD))のラットの交配前2週間および交配期間の2週間を通じて経口投与し、さらには雄では交配期間終了後20日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで連続投与し、親動物の反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

#### 1. 反復投与毒性

いずれの群にも死亡例は認められなかった。また、一般状態、体重および摂餌量にも雌雄ともに被験物質投与による影響は認められなかった。雄の精巣および精巣上体重量には、被験物質投与による影響は認められなかった。

剖検および生殖器系の病理組織学検査では、雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる所見は観察されなかった。

#### 2. 生殖発生毒性

交尾能、受胎能および性周期に被験物質投与の影響は認められなかった。また、分娩状態にも異常は観察されなかった。新生児の外表検査には、異常は認められず、体重にも群間差は認められなかった。死亡児および哺育4日の剖検では、被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。

以上の結果から、本試験条件下における2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の親動物に対する無影響量(NOEL)は雌雄とも1000 mg/kg/dayと判断された。生殖能および次世代児に対する影響はともに1000 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。

#### 方法

##### 1. 被験物質

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸〔三星化学工業(株)製造(東京)、純度99.3 wt%, Lot No. 7254〕は微黄色の粉末であり、使用時まで冷暗所で密栓保管した。本ロットは、投与期間中安定であったことを確認した。

被験物質は、ゴマ油(ナカライテスク(株)製造)に懸濁し、20, 60および200 mg/mLの濃度になるよう各群の投与液を調製した。調製後は、使用時まで遮光・冷蔵条件下

で保管した。投与液中の被験物質は、6および200 mg/mLの濃度の場合、遮光・冷蔵条件下で少なくとも7日間安定であることを確認した。

投与液の濃度および均一性の分析は、調製開始時に調製した各群のバッチから無作為にサンプルを抽出し実施した。その結果、表示濃度に対する誤差が-12.5から-0.4%の範囲であり、基準範囲内(±15%以内)であった。したがって、使用した投与液にはほぼ所定量の2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸が含有されていたことが確認された。

##### 2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー(株)(神奈川)から購入した生後8.5週齢のSprague-Dawley(Crj:CD(SD), SPF)系雌雄ラットを使用した。購入した動物は5日間検疫・馴化飼育した後、一般状態に異常が認められなかったものを10週齢で群分けして試験に用いた。群分け時の体重は、雄で375~414 g、雌で239~266 gの範囲であった。

動物は、温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数15回/時間、照度150~300 lux、照明時間12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)に設定されたバリアシステムの飼育室でアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに1匹ずつ収容し飼育した。妊娠18日以降の母動物は哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに哺育トレイおよび巣作り材料(Care FRESH<sup>TM</sup>, Absorption corporation製造)を入れて飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)製造のNMF固型飼料(放射線滅菌飼料)を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水を自由に摂取させた。

##### 3. 群分け

動物は投与開始日の体重をもとに層別化し、無作為抽出法により1群当たり12匹を振り分けた。

##### 4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

先に実施した「2-アミノ-5-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」<sup>1)</sup>は上限量である1000 mg/kg群の雄で尿比重の増加、尿pH、白血球数および総コレステロールの低下あるいは減少が、雌でGPTの増加、血糖の減少が認められ、剖検では雌雄ともに盲腸の拡張が認められた。これらの結果をもとに、0, 30, 100, 300および1000 mg/kgの用量で実施した予備試験「2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラ

ットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験-2週間投与予備試験」では、投与後症状、体重、摂餌量、器官重量に明らかな被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

従って、本試験においても予備試験同様1000 mg/kgを高用量とし、以下公比約3で除し、300および100 mg/kgを設定した。

投与容量は、体重100 g当り0.5 mLとし、交配前および交配期間中の雌雄では、個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行った。また、妊娠期間および哺育期間中の雌は、妊娠0, 7, 14, 21および哺育0日に測定した個体別体重に基づいて算出を行った。胃ゾンデを用いて毎日1回(7日/週)強制経口投与した。対照群にはゴマ油のみを同様に投与した。

雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後20日間の連続48日間とした。雌の投与期間は、交配前14日間と交配期間中(最長14日間)ならびに交尾成立雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで(41~46日間)とした。なお、交尾成立後分娩しなかった雌は妊娠25日の解剖前日までの41および43日間とした。交尾不成立の雌は交配期間終了後20日間の連続48日間とした。

## 5. 観察および検査

### 1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

### 2) 体重

雄では、投与1(投与開始日)、8, 15, 22, 29, 36, 43および49日(剖検日)に測定し、投与1から43日までの体重増加量を算出した。雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に測定し、投与1から15日までの体重増加量を算出した。交尾成立後の雌は、妊娠0, 7, 14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に測定し、それぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの体重増加量を算出した。

### 3) 摂餌量

雄では、投与1(投与開始日)、8, 15, 22, 29, 36, 43および48日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与22から48日までの累積摂餌量を算出した。雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に、交尾しなかった雌はそれ以降の投与29, 36, 43および48日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾成立の雌は妊娠0, 7, 14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともにそれぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかつ

た。

### 4) 交配

交配前14日間の性周期観察を行った雌を同群内の雄のケージに入れ1対1で最長14日間毎晩同居させた。翌朝、膣垢中の精子確認をもって交尾が成立したとし、その日を妊娠0日とした。性周期観察は交尾成立日まで行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した。交配結果から、各群について交尾率 $[(交尾動物数/同居動物数) \times 100]$ を算出した。

### 5) 自然分娩時および新生児の観察

妊娠動物は全例を自然分娩させた。分娩の確認は午前9時から10時に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体および分娩を開始した個体については分娩完了まで待って、その日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩が完了した個体については、翌日を哺育0日とした。分娩を確認した全例について妊娠期間(哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数)、受胎率 $[(受胎動物数/交尾動物数) \times 100]$ 、出産率 $[(生児出産雌数/妊娠雌数) \times 100]$ 、着床率 $[(着床痕数/妊娠黄体数) \times 100]$ 、分娩率 $[(総出産児数/着床痕数) \times 100]$ 、出生率 $[(出生生児数/総出産児数) \times 100]$ を算出した。妊娠25日の午前9時までに分娩のみられない動物は病理解剖した。母動物は哺育4日に病理解剖した。

新生児は哺育0日に出産児数(生存児+死亡児)を調べ、性別を判定するとともに外表異常の有無を調べた。また、哺育0および4日に雌雄別の同腹児重量を測定し、1腹の雌雄別1匹当りの平均体重を算出した。

哺育4日の新生児の同腹児重量を測定後に新生児全例をエーテル麻酔により安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った。なお、哺育期間中の死亡児についてはブアン氏液に固定し、主要器官の肉眼観察を行った。また、新生児の4日の生存率 $[(哺育4日生児数/出生生児数) \times 100]$ を求めた。

### 6) 病理学検査

#### a) 剖検および器官重量

##### ① 雄動物

48日間投与した翌日、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比(相対重量)を算出した。また、全動物の精囊、前立腺および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として肺、肝臓および皮膚を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、精巣および精巣上体はブアン氏液で固定した。

##### ② 自然分娩した雌

哺育4日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、卵巣、子宮、膣および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として肺、皮膚、胸腺、胃および副腎を10%中性緩衝ホルマリン液で固

定した。また、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

### ③ 交尾しなかった雌

48日間投与した翌日、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、卵巣、子宮および膣を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

### ④ 自然分娩の認められない雌

妊娠25日に、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、卵巣、子宮および膣を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。着床痕が認められない動物は妊娠不成立と判定した。

### ⑤ 哺育期間中に全児が死亡した母動物(全児死亡動物)

生存児すべての死亡または喰殺が確認された日に、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、卵巣、子宮、膣および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として胸腺を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

なお、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

## b) 病理組織学検査

### ① 全児死亡動物

対照群の2例の卵巣、子宮および膣、1例の胸腺について実施した。

### ② 妊娠を成立させた雄

対照群および1000 mg/kg群のそれぞれ11および12例で精巣および精巣上体について実施した。加えて、対照群および300 mg/kg群各1例の肺、300および1000 mg/kg群各1例の皮膚、300 mg/kg群1例の肝臓、精巣および精巣上体について実施した。

### ③ 自然分娩した雌

対照群および1000 mg/kg群のそれぞれ9および12例で卵巣について実施した。加えて、100 mg/kg群1例の卵巣および皮膚、300 mg/kg群1例の胸腺、1000 mg/kg群1例の胃、副腎、肺、2例の胸腺について実施した。

### ④ 交尾しなかった雌雄

100 mg/kg群の雌雄各1例の卵巣、子宮、膣、精巣、精巣上体、精囊および前立腺について実施した。

### ⑤ 妊娠を成立させなかった雄および妊娠不成立の雌

対照群および100 mg/kg群の雌雄各1例の卵巣、子宮、膣、精巣、精巣上体、精囊および前立腺について実施した。

## 6. 統計解析

体重、摂餌量、黄体数、着床痕数、出産児数、死産児数、性比、平均性周期、妊娠期間、着床率、分娩率、出生率、外表異常発現率、新生児の4日の生存率、器官重

量および相対重量については多重比較検定<sup>2,4)</sup>を行った。

出産率、交尾率および受胎率については $\chi^2$ 検定<sup>5,6)</sup>を用いた。病理学検査の所見の発生率については、Fisherの直接確率検定法<sup>6)</sup>を用いて検定した。なお、哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は\*: $P<0.05$ および\*\*: $P<0.01$ の2段階とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 死亡および一般状態

死亡例は、投与期間を通じ、雌雄いずれの群にも観察されなかった。一般状態の観察では、被験物質投与に起因した変化は認められず、雄の100 mg/kg群で眼分泌物が1例、300 mg/kg群で脱毛が1例、1000 mg/kg群で痂皮および脱毛が1例に認められた。雌では妊娠期間および哺育期間を通じ100 mg/kg群で脱毛が1例、対照群で全児死亡動物が2例に認められた。

#### 2) 体重(Fig. 1, 2)

雄では、投与期間を通じて対照群と各被験物質投与群との間に差は認められなかった。

雌では、100および1000 mg/kg群で対照群に比べ哺育4日のみ統計学的に有意な低値を示した。しかし、他の測定日には明らかな差は認められず1日のみの変化であること、また、哺育期間の体重増加量には明らかな変化が認められていないことから、被験物質投与の影響では無く偶発的な変化と考えられた。

#### 3) 摂餌量(Fig. 3, 4)

雄では、1000 mg/kg群で投与8から15日の平均1日摂餌量が統計学的に有意な高値を示し、投与1から15日の累積摂餌量も高値を示した。

雌では、投与期間を通じて対照群と各被験物質投与群との間に差は認められなかった。

#### 4) 器官重量(Table 1)

300 mg/kg群で対照群に比べ精巣上体の実重量が統計学的に有意な低値を示したが、相対重量には差はなく、1000 mg/kg群では同様の変化は認められなかった。精巣重量には対照群と各被験物質投与群との間に差は認められなかった。

#### 5) 剖検所見

いずれの動物にも被験物質投与に起因すると考えられる所見は認められなかった。

雄では、所見として肺の黒色斑点が対照群および300 mg/kg群で各1例、肝臓の赤色斑点および白色斑点が300 mg/kg群で同一個体の1例、精巣および精巣上体の萎縮が300 mg/kg群で同一個体の1例、被毛の菲薄化が300および1000 mg/kg群で各1例に観察された。

自然分娩した雌は対照群、100、300および1000

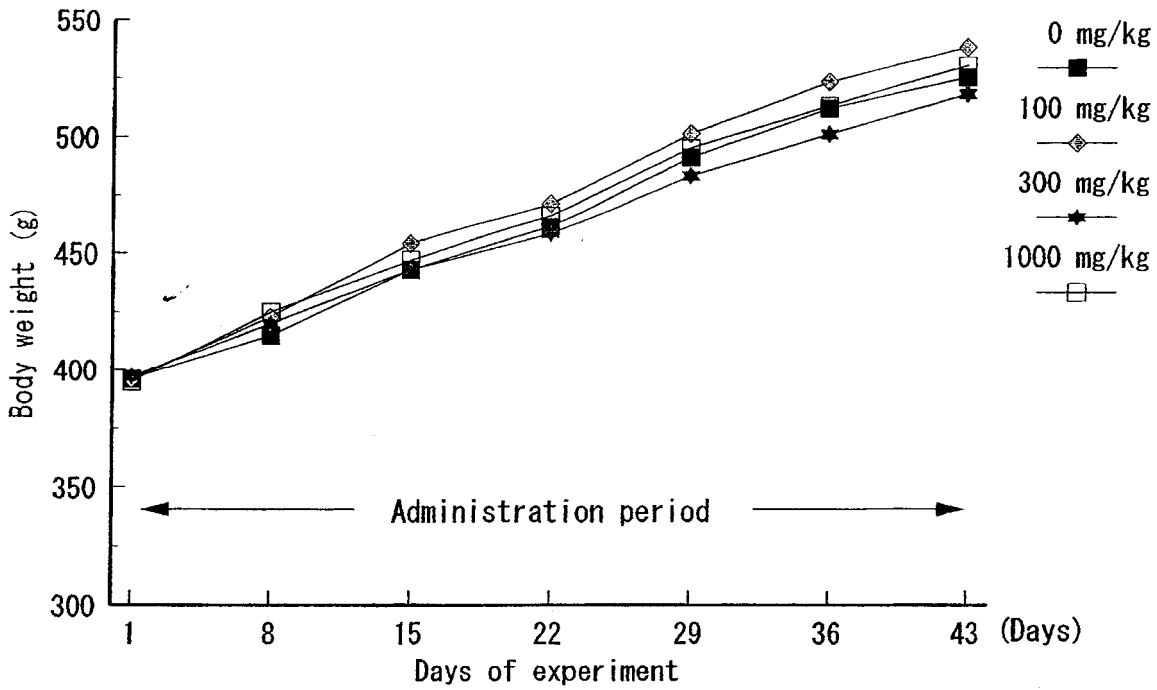


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

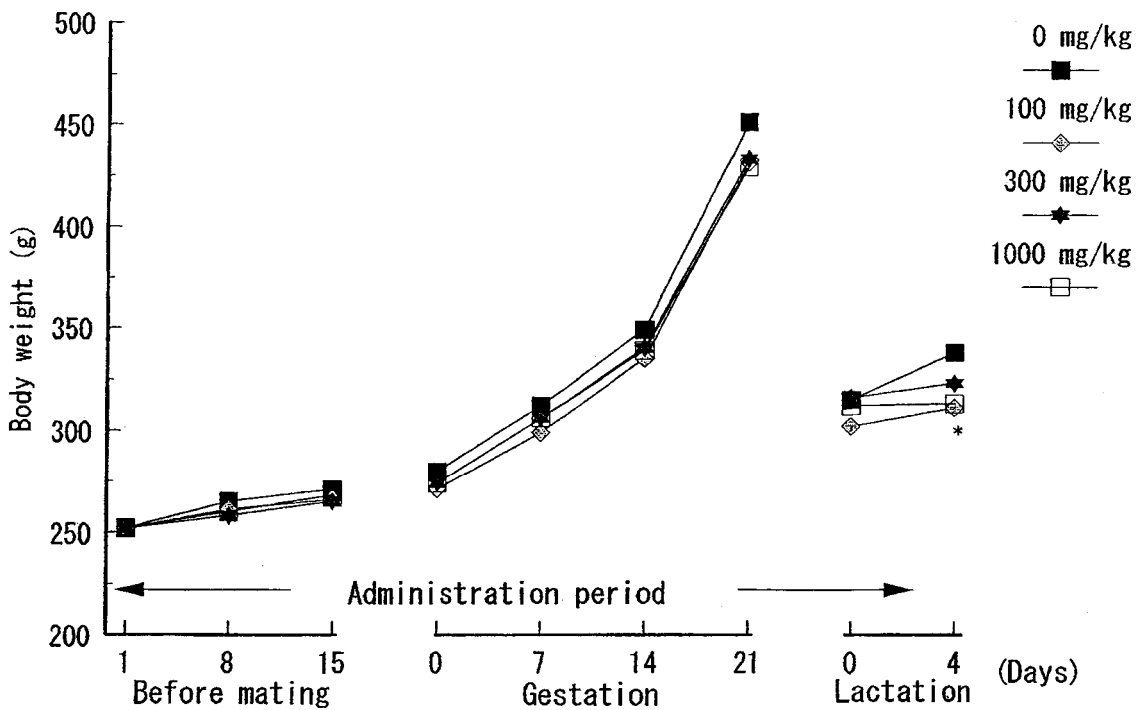


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

Significant difference from control group; \*:  $P < 0.05$

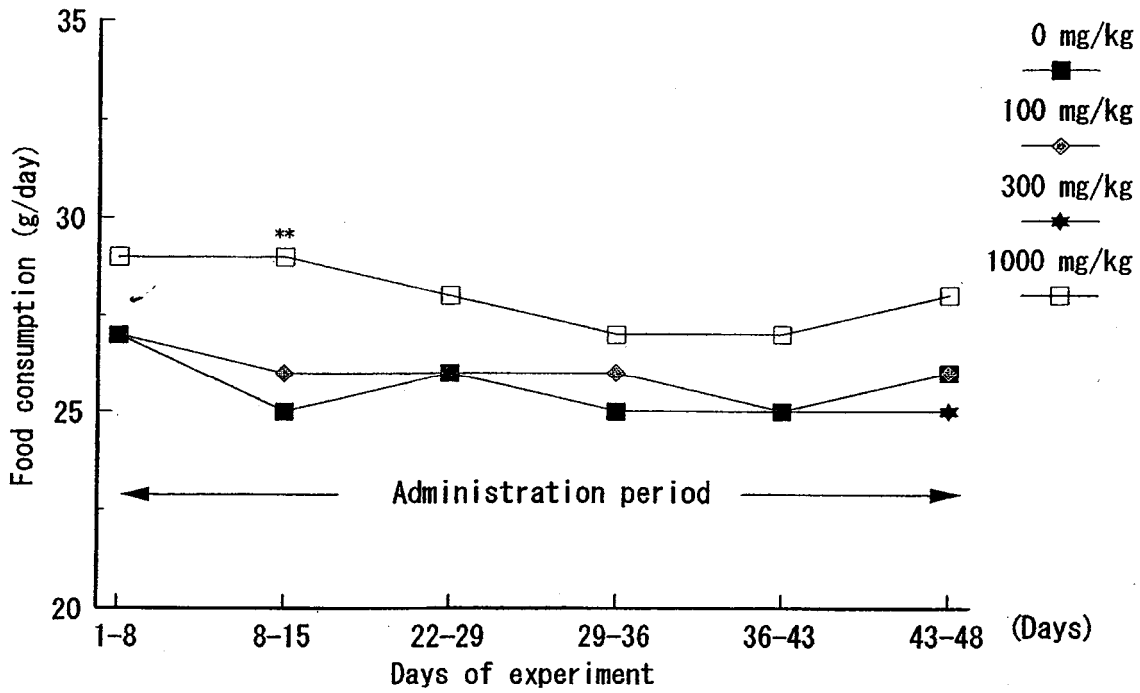


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

Significant difference from control group; \*\*:P<0.01

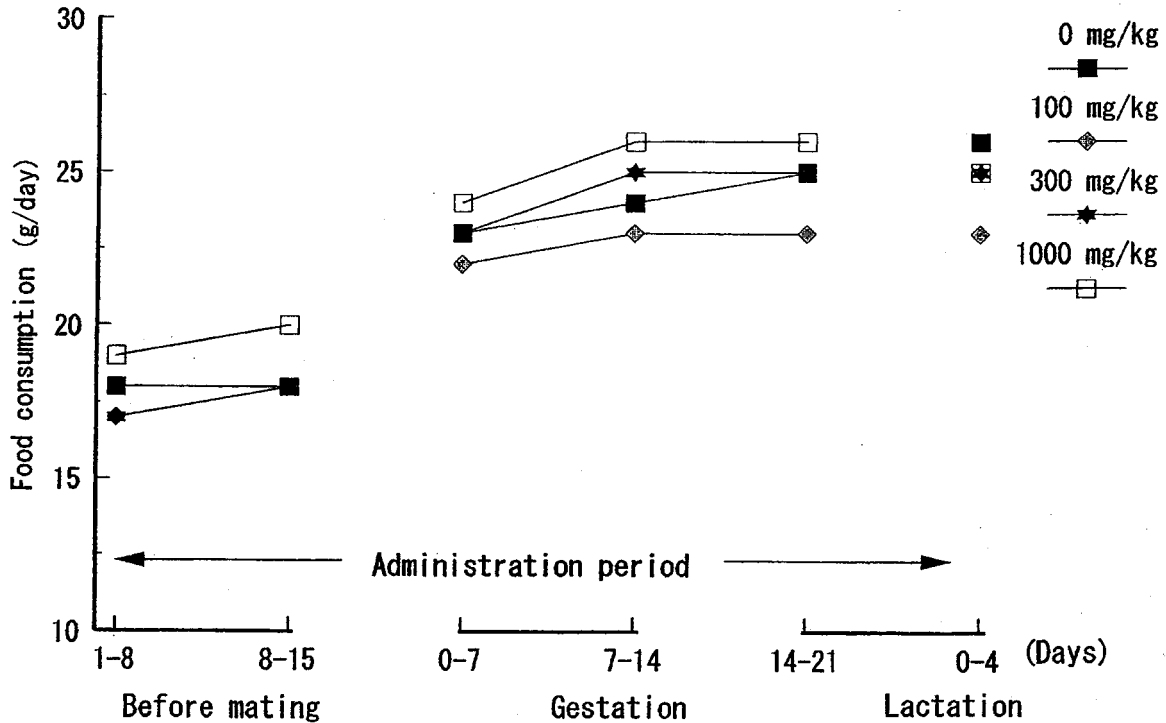


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

mg/kg群でそれぞれ9, 10, 12および12例であった。所見として胸腺の萎縮が300および1000 mg/kg群でそれぞれ1および2例, 肺の黒色斑点, 胃の潰瘍および副腎の白色斑点が1000 mg/kg群で各1例, 卵巣の嚢胞および被毛の菲薄化が100 mg/kg群で各1例に観察された。

交尾しなかった100 mg/kg群の雌1例では, 異常所見は観察されなかった。

自然分娩の認められない雌は対照群および100 mg/kg群で各1例であったが, いずれの動物にも異常所見は観察されなかった。

対照群の2例の全児死亡動物では, 胸腺の萎縮および子宮の結節が1例に観察され, 他の1例には異常所見は認められなかった。

## 6) 病理組織学検査 (Table 2)

雄では, 1000 mg/kg群で精巣上体の細胞浸潤が1例に観察された他, 剖検で精巣および精巣上体の萎縮が認められた300 mg/kg群の動物に精巣の精細管萎縮および間質細胞増生, 精巣上体の精子減少が観察された。しかしながら, 低頻度の発現であることから被験物質の影響ではないと考えた。その他, 肺の炎症が対照群および300 mg/kg群で各1例, 肝臓の壊死が300 mg/kg群で1例, 皮膚の糜爛および扁平上皮増生が1000 mg/kg群で1例に観察された。

自然分娩した雌では, 卵黄嚢嚢胞が100 mg/kg群の1例に観察されたのみで被験物質の卵巣におよぼす影響はないと考えられた。その他, 胸腺の萎縮が300および1000 mg/kg群でそれぞれ1および2例, 肺の炎症が1000 mg/kg群で1例, 胃の潰瘍が1000 mg/kg群で1例, 副腎皮質の局所的肥大が1000 mg/kg群で1例, 皮膚の炎症浸潤と扁平上皮増生が100 mg/kg群の1例に観察された。

交尾しなかった雌雄では, 雄に精巣の精細管萎縮が観察された。雌には異常所見は認められなかった。

妊娠を成立させなかった雄および不妊の雌では, いずれにも異常所見は観察されなかった。

全児死亡動物では, 胸腺の萎縮および子宮の化膿性炎症が1例に観察された。他の1例には異常所見は観察されなかった。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 交尾および受胎能 (Table 3)

交尾は, 100 mg/kg群を除くすべての群で全例成立し, 100 mg/kg群では1組が交尾不成立で12例中11例(91.7%)で成立した。受胎は, 300および1000 mg/kg群で交尾が成立した雌の全例で成立した。対照群および100 mg/kg群の各1例では, 妊娠25日剖検で着床痕が認められなかったため不妊と判断した。したがって, 対照群では12例中11例(91.7%), 100 mg/kg群では11例中10例(90.9%)で受胎が成立した。

性周期観察では, いずれの群もほぼ4から5日の性周期を示し平均性周期に群間差は認められなかった。

### 2) 分娩および哺育 (Table 4)

分娩状態に異常は観察されず, 各群の妊娠期間, 黄体数, 着床痕数, 出産児数, 出產生児数および死産児数はほぼ同様な値を示し, 出産率, 着床率, 出生率および哺育4日生存率に群間差は認められなかった。

### 3) 新生児の形態, 体重および剖検所見

新生児の外表検査では, 異常をとまう児は1例も認められなかった。

哺育期間中の体重では, 雌雄ともにいずれの測定日にも群間差は認められなかった。

哺育期間中の死亡児の剖検では, 被験物質投与に起因すると思われる所見は認められず, 胸腺頸部残留および腎盂拡大が対照群の雄に認められたのみであった。雌には異常所見は認められなかった。哺育4日の剖検では, 雄では胸腺頸部残留が対照群で1例, 腎臓の腎盂拡大が300 mg/kg群で1例, 雌では腎臓の腎盂拡大が対照群および300 mg/kg群でそれぞれ1および3例に認められた。いずれも少数例での発現であり, 被験物質投与とは関連のない変化であった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

雌雄とも一般状態の変化および体重に被験物質投与の影響は認められなかった。

摂餌量については, 雄の1000 mg/kg群で投与8から15日の間の平均1日摂餌量および投与1から15日の累積摂餌量が高値を示した。しかし, 同群の体重には明らかな変化は認められていないこと, 28日間反復投与毒性試験および2週間投与予備試験では同様の結果は認められていないことから, 被験物質投与による毒性影響とは判断しなかった。

病理学検査では, 雄の精巣および精巣上体, 雌の卵巣に被験物質投与の影響は認められなかった。なお, 全児死亡動物, 妊娠を成立させなかった雄および不妊の雌については, 特に原因を示唆する所見は認められなかった。交尾しなかった雄では, 組織所見で精巣の精細管萎縮が認められた。しかし, 交尾不成立の一要因となった可能性が示唆されるものの, 発現頻度から被験物質投与との関連は無いと判断された。

したがって, 本試験条件下における2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の親動物に対する無影響量は, 最高用量の1000 mg/kgでも影響は認められなかったことから雌雄とも1000 mg/kg/dayと判断された。

### 2. 生殖発生毒性

性周期, 交尾率, 受胎率, 妊娠期間, 妊娠黄体数, 着床痕数, 出産児数, 出產生児数, 性比, 哺育4日生存率, 出生率, 着床率, 出生率および哺育4日生存率に被験物質投与の影響は認められなかった。また, 新生児の外表検査でも異常は認められず, 体重にも群間差は認められなかった。死亡児および哺育4日の剖検では, 被験物質

投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。

以上のことから、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の生殖能および次世代児に対する影響はともに1000 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。

#### 文献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 4, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1996, p. 99.
- 2) C. G. Shayne, “Statics and Experimental Design For Toxicologists,” Telford Press, New Jersey, 1986, pp. 43-45.
- 3) 佐野正樹, 医薬安全性研究会会報, 32, 21(1990).
- 4) M. Yoshida, *J. Japanese Soc. Comp. Statist.*, 1, 111(1988).
- 5) 佐久間昭, “薬効評価I-計画と解析-,” 東京大学出版会, 東京, 1977, pp. 109-117.
- 6) 石居進, “生物統計学入門,” 培風館, 東京, 1975, pp. 78-107.

#### 連絡先

試験責任者: 伊藤圭一

試験担当者: 小川敏明, 伊賀達也, 木原 亨

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜  
582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

#### Correspondence

Authors: Keiichi Ito (Study director)

Toshiaki Ogawa, Tatsuya Iga,

Tohru Kihara

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden, Arahama, Fukude-cho, Iwata-  
gun, Shizuoka, 437-1213, Japan.

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

簡易生殖毒性試験

Table 1 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2-amino-5-methyl benzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Male					
No. of animals examined		12	12	12	12
Body weight	(g)	542 ± 33	554 ± 45	534 ± 36	546 ± 3
Absolute organ weight					
Testes	(g)	3.62 ± 0.31	3.65 ± 0.44	3.28 ± 0.59	3.70 ± 0.23
Epididymides	(mg)	1313 ± 98	1295 ± 138	1168 ± 121*	1316 ± 115
Relative organ weight					
Testes	(g%)	0.671 ± 0.074	0.664 ± 0.094	0.616 ± 0.119	0.680 ± 0.066
Epididymides	(mg%)	243.378 ± 27.682	235.898 ± 34.456	219.293 ± 27.989	242.189 ± 27.983

Values are expressed as Mean±S.D.  
Significant difference from control group; \*:P<0.05

Table 2 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necropsied	0	100	300	1000	0	100	300	1000
Organ Findings	11	10	12	12	9	10	12	12
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
thymus								
atrophy	-	-	-	-	-	-	1(1)	2(2)
RESPIRATORY SYSTEM								
lung								
inflammation	1(1)	-	1(1)	-	-	-	-	1(1)
DIGESTIVE SYSTEM								
stomach								
ulcer, forestomach	-	-	-	-	-	-	-	1(1)
liver								
necrosis	-	-	1(1)	-	-	-	-	-
REPRODUCTIVE SYSTEM								
testis								
atrophy, seminiferous tubule	0	-	1(1)	0	-	-	-	-
interstitial cell hyperplasia	0	-	1(1)	0	-	-	-	-
epididymis								
decrease, sperm	0	-	1(1)	0	-	-	-	-
cellular infiltration	0	-	0(1)	1	-	-	-	-
ovary								
cyst, brusa	-	-	-	-	0	1(1)	-	0
ENDOCRINE SYSTEM								
adrenal gland								
hypertrophy	-	-	-	-	-	-	-	1(1)
INTEGUMENTARY SYSTEM								
skin								
erosion	-	-	0(1)	1(1)	-	0(1)	-	-
inflammatory infiltration	-	-	0(1)	1(1)	-	1(1)	-	-
squamous hyperplasia	-	-	0(1)	1(1)	-	1(1)	-	-

( ): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.



Table 3 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	11	12	12
No. of pregnant females	11	10	12	12
Copulation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	91.7	100.0	100.0
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	91.7	90.9	100.0	100.0
Estrus cycle (days, Mean±S.D.)	4.5 ± 0.7	4.2 ± 0.5	4.2 ± 0.4	4.5 ± 0.5

a) : (No. of animals with successful copulation/no. of animals mated)×100

b) : (No. of pregnant animals/no. of animals with successful copulation)×100

Values in parentheses are expressed no. of animals observed

Table 4 Findings of delivery in dams treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid and observations on their pups (F<sub>1</sub>) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of dams observed	11	10	12	12
No. of dams delivered live pups	11	10	12	12
Duration of gestation (Mean±S.D.)	22.7 ± 0.6	22.4 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.8 ± 0.4
No. of total corpora lutea (Mean±S.D.)	216 (19.6 ± 4.5)	170 (17.0 ± 2.1)	218 (18.2 ± 3.7)	222 (18.5 ± 3.2)
No. of total implants (Mean±S.D.)	188 (17.1 ± 1.6)	161 (16.1 ± 2.0)	186 (15.5 ± 3.0)	175 (14.6 ± 3.0)
No. of total pups born (Mean±S.D.)	172 (15.6 ± 1.6)	150 (15.0 ± 1.8)	178 (14.8 ± 2.6)	160 (13.3 ± 3.3)
No. of total live pups born (Mean±S.D.)	168 (15.3 ± 2.3)	150 (15.0 ± 1.8)	178 (14.8 ± 2.6)	160 (13.3 ± 3.3)
Male	81 ( 7.4 ± 1.9) <sup>d)</sup>	69 ( 6.9 ± 2.3) <sup>d)</sup>	91 ( 7.6 ± 2.4) <sup>e)</sup>	79 ( 6.6 ± 1.8)
Female	87 ( 7.9 ± 1.9) <sup>d)</sup>	81 ( 8.1 ± 1.7) <sup>d)</sup>	87 ( 7.3 ± 1.9) <sup>e)</sup>	81 ( 6.8 ± 2.7)
Sex ratio (male/female, Mean±S.D.)	1.00 ± 0.41	0.93 ± 0.51	1.13 ± 0.43	1.21 ± 0.81
No. of total live pups on day 4 (Mean±S.D.)				
Male	66 ( 6.0 ± 3.2)	66 ( 6.6 ± 2.2)	85 ( 7.1 ± 2.5)	78 ( 6.5 ± 1.7)
Female	66 ( 6.0 ± 3.3)	77 ( 7.7 ± 1.4)	80 ( 6.7 ± 1.6)	79 ( 6.6 ± 2.6)
No. of total dead pups born (Mean±S.D.)	4 ( 0.4 ± 1.2)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)
stillbirth	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)
cannibalism	4 ( 0.4 ± 1.2)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index (% , Mean±S.D.) <sup>b)</sup>	89.5 ± 12.3	94.7 ± 2.0	86.6 ± 15.8	80.2 ± 18.2
Delivery index (% , Mean±S.D.) <sup>c)</sup>	91.6 ± 5.6	93.5 ± 7.7	96.2 ± 4.8	90.9 ± 8.6
Live birth index (% , Mean±S.D.) <sup>d)</sup>	97.4 ± 8.6	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Viability index on day 4 (% , Mean±S.D.) <sup>e)</sup>				
Male	77.8 ± 39.1	96.0 ± 8.4	93.1 ± 9.7	99.1 ± 3.2
Female	77.0 ± 39.1	95.7 ± 5.6	94.4 ± 15.8	98.0 ± 4.8

a) : (No. of females with live pups/no. of pregnant females)×100

b) : (No. of implant /no. of corpora lutea)×100

c) : (No. of pups born/no. of implants)×100

d) : (No. of live pups born/no. of pups born)×100

e) : (No. of live pups on day 4 after birth/no. of live pups born)×100

f) : Includes live pups died before observations