

Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

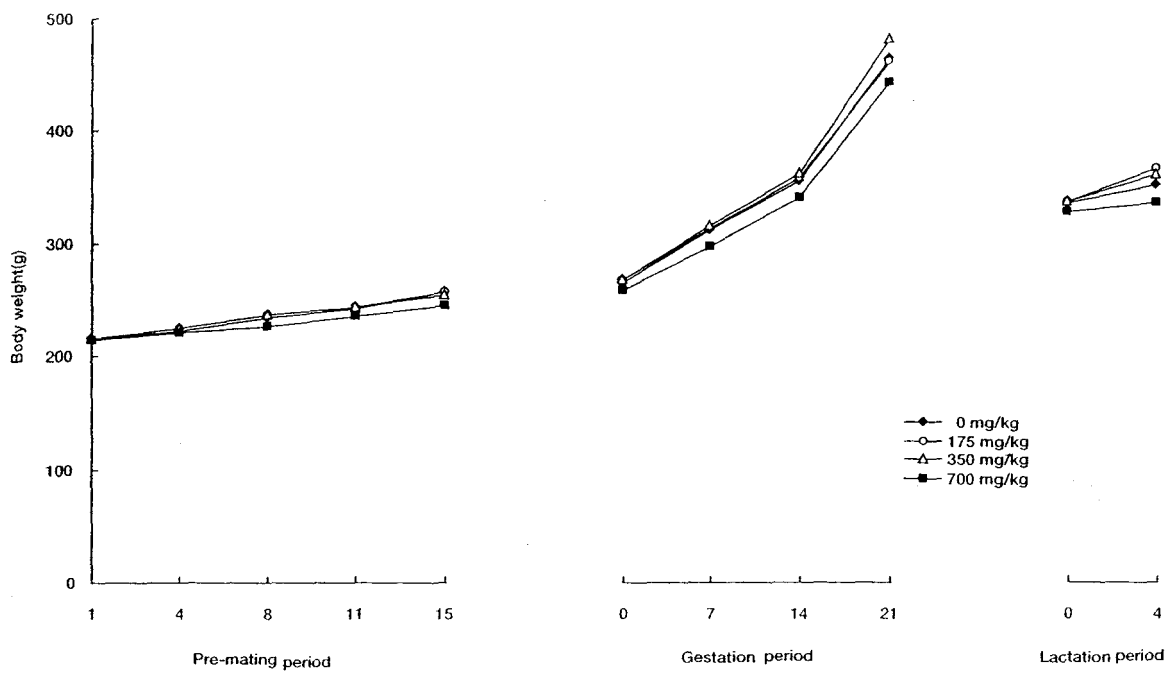


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

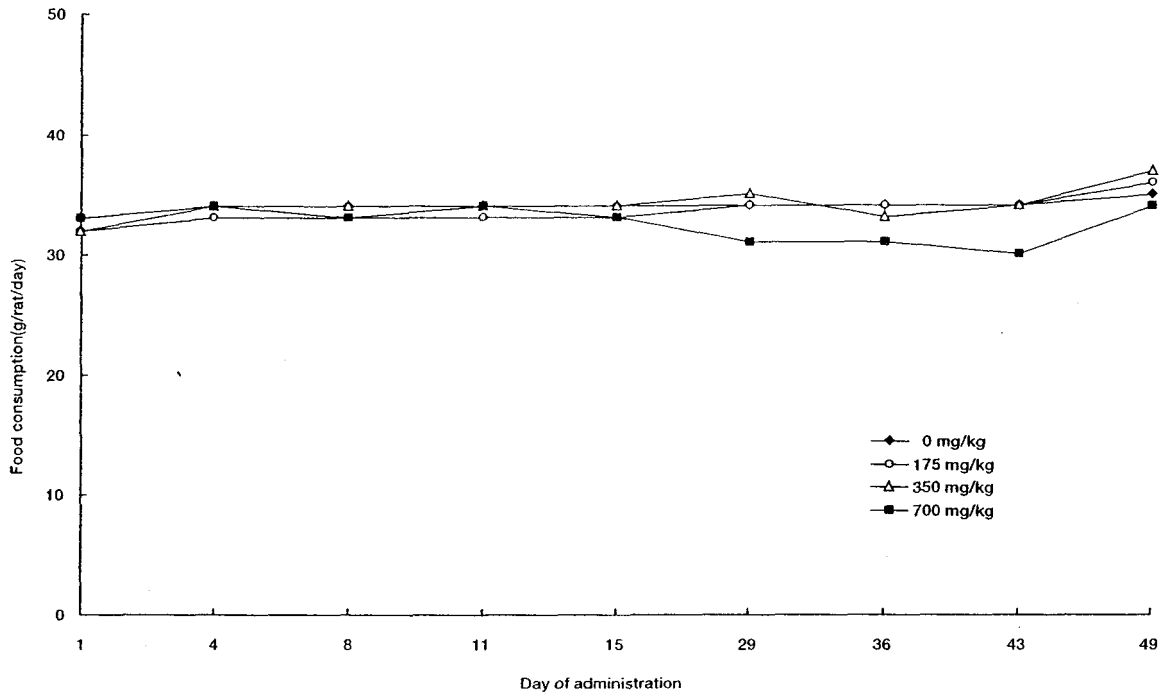


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

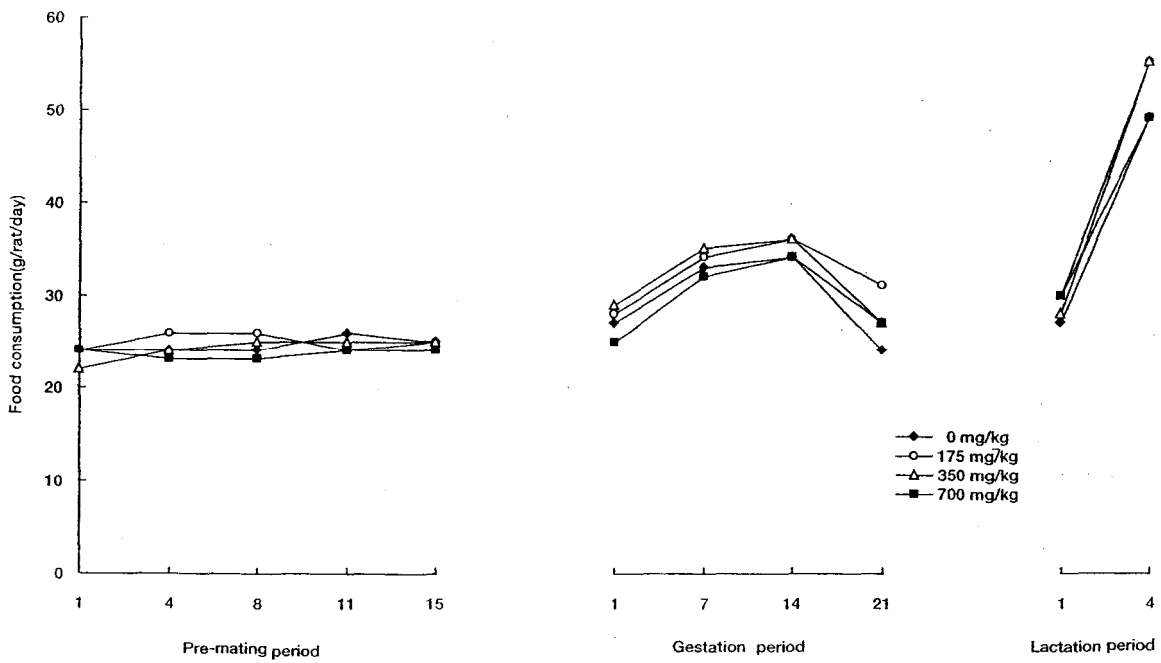


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

て被験物質投与との関連はないものと考えられた。また、肉眼的異常部位についても病理組織学検査を行ったが、被験物質投与との関連を示唆する変化は認められなかった。

### 8) 精細管のステージ分類

精細管のステージI～VI, VII～VIII, IX～XIおよびXII～XIVの相対的発現頻度は対照群と700 mg/kg群の間に有意差は認められなかった。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 生殖機能 (Table 8)

被験物質投与群における性周期、すなわち観察期間中における発情期像発現回数および発情期から次の発情期までの日数は対照群とはほぼ同等で有意差は認められなかった。交配成績については、被験物質投与群のほとんどの組み合わせが同居開始後5日以内に交尾し、交尾率は100%であった。また、交尾までに要した日数にも有意差は認められなかった。さらに、被験物質投与群の受胎率は90.9～100%であり、対照群との間に有意差は認められなかった。

### 2) 分娩および哺育状態 (Table 9)

不妊例を除くいずれの例も妊娠23日までに分娩終了が確認され、分娩異常はみられなかった。また、被験物質投与群における妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、出産率、分娩率および出生率は対照群と同等で有意差は認められなかった。

哺育状態では、各群いずれの例においても巣作り、児集めおよび授乳などの哺育行動に異常は認められなかった。

### 3) 新生児の形態観察、生存性、体重および剖検所見 (Table 10)

新生児の外表検査では各群のいずれにも異常はみられなかった。被験物質投与群における性比および生存児数は対照群とはほぼ同等で有意差は認められなかった。しかし、哺育0および4日の雌雄体重、新生児の4日の生存率は700 mg/kg群で低値傾向であった。哺育4日の剖検では、被験物質投与に関連する変化はみられなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

雄では、700 mg/kg群で喘鳴が投与17日以降4例にみられた。ついで一部の動物に一部が黒色を呈する軟便、または腹部膨満、肛門周囲の汚染および粗毛がみられた。本剤はウサギの眼に高度、皮膚に中等度の刺激性を有することが知られている<sup>1)</sup>。したがって、喘鳴は本剤の経口投与時の誤嚥により鼻腔や喉頭への刺激に関連した変化と考えられ、腹部膨満は刺激性の被験液を誤嚥したことによる鼻腔の一時的な閉塞によって過呼吸が生じ空気の嚥下により消化管が拡張したものと推測された。また、

肛門周囲の汚染および粗毛は体重が減少していることから全身状態の悪化に起因した変化と考えられ、一部が黒色を呈する軟便は腺胃の糜爛と表層性出血を反映したものと推測された。同群では投与4日以降に体重増加の抑制がみられ、投与29～43日の摂餌量に低値傾向または低値が認められた。また、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の低値が認められた。赤血球数が高値であった1例を除いた場合、前述の変化に加えヘモグロビン量およびヘクトクリット値にも低値(ヘモグロビン量:対照群の15.9 g/dLに対し700 mg/kg群で14.9 g/dL, ヘマトクリット値:対照群の46%に対し700 mg/kg群で44%)がみられ、血清鉄に高値が認められた。しかし、溶血を示唆する明らかな変化はみられず、メトヘモグロビンに異常がみられないことから、胃の障害に関連する変化というよりはむしろ骨髄などにおける血色素の合成に対する被験物質投与の影響が示唆された。なお、鉄欠乏性貧血の程度については、網状赤血球の増加、骨髄像検査における赤血球系細胞比率、M/E比の異常および骨髄に組織学的な異常がないことから、軽度な変化と考えられた。さらに、肉眼的に胃の境界線の肥厚、腺胃の暗赤色点と糜爛、組織学的に境界線粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮、腺胃の糜爛と表層性出血がみられた。境界線粘膜の過形成、腺胃の糜爛や潰瘍などは刺激性物質を経口投与した際にしばしばみられることから、胃の変化は本剤の刺激性によるものと考えられた。

350 mg/kg群においては、肉眼的に胃の境界線の肥厚、組織学的に境界線粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮がみられた。

175 mg/kg群においては、いずれの観察、測定および検査においても被験物質投与の影響は認められなかった。

雌では、700 mg/kg群で1例が死亡し、1例を切迫屠殺した。切迫屠殺動物は体重の減少と摂餌量の低値、喘鳴、腹部膨満の他に全身状態の悪化症状がみられ、肉眼的に消化管のガス貯留と拡張、組織学的に腺胃の出血と浮腫、十二指腸、空腸および回腸の粘膜萎縮がみられた。ラットでは鼻腔を閉塞すると消化管の拡張が生じ、死に至ることが報告されている<sup>2,3)</sup>。本試験においても経口投与した刺激性を有する被験液の誤嚥により鼻腔を閉塞することによって過呼吸が生じ、空気の嚥下により消化管が拡張したと考えられた。これに伴う摂食不良と胃腸障害が加わり瀕死に至ったと考えられた。死亡動物については、体重が減少し、喘鳴、一部が黒色を呈する軟便、耳介の蒼白化、肛門周囲の汚染および削瘦がみられ、病理学検査で(胃、小腸、大腸は死後変化のため不明)胸腺、脾臓および子宮の萎縮が認められた。切迫屠殺動物と同様に体重の減少、喘鳴および胃腸管からの出血を示唆する一部が黒色を呈する軟便、貧血状態を示唆する耳介の蒼白化がみられていることから、切迫屠殺動物と同様な経過で死に至った可能性が考えられた。その他に、雄と同様、被験液の刺激性に関連したと考えられる喘鳴が3例みられた。同群では投与8日以降に体重増加の抑制傾向がみられた。病理学検査では、雄と同様、肉眼的に胃

の境界縁の肥厚、腺胃の暗赤色点散在と一部陥凹がみられ、組織学的に境界縁粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮、腺胃の糜爛と表層性出血がみられた。

350 mg/kg群においては、組織学的に境界縁粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮がみられた。

175 mg/kg群においては、いずれの観察、測定および検査においても被験物質投与の影響は認められなかった。

以上の如く、350 mg/kg群以上の雌雄で胃の境界縁粘膜の過形成、噴門部粘膜の萎縮、さらに700 mg/kg群雌雄で腺胃の糜爛と表層性出血、一部が黒色を呈する軟便などがみられた。また、雄において体重増加の抑制、摂餌量の低値、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の低値、総蛋白質および $\alpha_1$ -グロブリン分画比率の低値、雌については死亡が1例、切迫屠殺が1例みられ、体重増加の抑制が認められた。したがって、本試験条件下における2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の一般毒性学的な無毒性量は、雌雄ともに175 mg/kg/dayであると判断された。

## 2. 生殖発生毒性

700 mg/kg群においても性周期、交尾までに要した日数、交尾率および受胎率に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。また、精巣および精巣上体に組織学的な変化ならびに精細管のステージ分類に異常は認められず、精子の発生および発育に対する精巣毒性もないと考えられた。雌動物では、妊娠期間および分娩に異常は認められず、黄体数、着床痕数、着床率、総出産児数、出産率および分娩率にも被験物質投与の影響は認められなかった。さらに、分娩後の哺育行動にも異常は認められなかった。したがって、700 mg/kgの用量においても雌雄親動物の生殖能力に及ぼす影響はないと考えられた。

新生児に及ぼす影響に関して、700 mg/kg群においても新生児に外表異常は認められず、性比、生存児数、死産児数および出生率に被験物質投与の影響は認められなかった。しかし、700 mg/kg群で雌雄体重の低値傾向と哺育4日における生存率の低値傾向が認められた。本変化は母体の妊娠および哺育期間中における毒性変化に起因する二次的な変化と推測された。

以上の如く、雌雄親動物の生殖能力に関しては、700 mg/kg群においても被験物質投与の影響は認められなかった。新生児の発生および生後の発育に関しては、700 mg/kg群の雌雄体重の低値傾向と哺育4日における生存率の低値傾向が認められた。したがって、本試験条件下における2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の生殖発生毒性学的な無毒性量は雌雄親動物ともに700 mg/kg/day、新生児の無影響量は350 mg/kg/dayと判断された。

## 文献

- 1) M.J. Prague, "Prehled Prumyslove Toxikologie; Organicke Latky," Czechoslovakia, Avicenum, 1986, p. 1055.
- 2) C. Madsen. *Lab. Anim.*, 23 (1) (1989).
- 3) K. Nakajima, G. Ohi, *Exp. Anim.*, 26(2), 149(1977).

## 連絡先

試験責任者：石田茂

試験担当者：片平勝也，小川順子，

畠山和久，田村一利，

津田敏治，勝亦俱慶

(株)ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284

Tel 0550-82-9912 Fax 0550-82-9913

## Correspondence

Authors: Shigeru Ishida (Study director)

Katsuya Katahira, Junko Ogawa,

Kazuhisa Hatayama, Kazutosi Tamura,

Toshiharu Tsuda, Tomoyoshi Katsumata

Bozo Research Center Inc. Gotemba Laboratory

1284 Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka-ken,

412-0039, Japan

Tel +81-550-82-9912 Fax +81-550-82-9913

Table 1 Hematological examination of male rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	175	350	700
No. of animals	12	12	12	12
RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	816 $\pm$ 31	835 $\pm$ 41	824 $\pm$ 47	855 $\pm$ 70
Hb (g/dL)	15.9 $\pm$ 0.4	15.9 $\pm$ 0.4	15.8 $\pm$ 0.6	15.3 $\pm$ 1.3
metHb (%)	0.40 $\pm$ 0.08	0.46 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.11	0.44 $\pm$ 0.09
Ht (%)	46 $\pm$ 1	46 $\pm$ 1	46 $\pm$ 3	45 $\pm$ 4
MCV ( $\mu^3$ )	56.6 $\pm$ 1.0	55.3 $\pm$ 1.5	56.0 $\pm$ 1.2	52.8** $\pm$ 2.7
MCH (pg)	19.5 $\pm$ 0.5	19.0 $\pm$ 0.8	19.2 $\pm$ 0.4	17.9** $\pm$ 1.3
MCHC (%)	34.4 $\pm$ 0.6	34.4 $\pm$ 0.9	34.2 $\pm$ 0.8	33.8 $\pm$ 1.2
Reticulocyte (%)	20 $\pm$ 3	20 $\pm$ 3	21 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3
Platelet ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	105.6 $\pm$ 10.0	103.5 $\pm$ 12.5	106.6 $\pm$ 11.7	114.5 $\pm$ 15.3
PT (sec.)	12.3 $\pm$ 0.3	12.3 $\pm$ 0.5	12.2 $\pm$ 0.4	12.0 $\pm$ 0.7
APTT (sec.)	14.4 $\pm$ 1.3	13.9 $\pm$ 1.5	14.1 $\pm$ 1.1	13.7 $\pm$ 1.3
Fibrinogen (mg/dL)	264 $\pm$ 20	267 $\pm$ 31	272 $\pm$ 17	254 $\pm$ 18
WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	112 $\pm$ 26	117 $\pm$ 23	108 $\pm$ 22	124 $\pm$ 38
Differential leukocyte counts (%)				
Lymphocyte	88.4 $\pm$ 3.0	86.6 $\pm$ 4.5	86.1 $\pm$ 5.2	84.4 $\pm$ 8.9
Stab	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Segmented	10.8 $\pm$ 3.0	12.9 $\pm$ 4.2	12.8 $\pm$ 5.2	14.9 $\pm$ 9.2
Eosinophil	0.7 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.7
Basophil	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocyte	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.2
Others	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0

Significantly different from the 0 mg/kg group; \*\*:P&lt;0.01

Table 2 Myelogram examination of male rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	175	350	700
No. of animals	12	12	12	12
Erythrocytic cells				
Proerythroblast	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
Basophilic	0.7 ± 0.4	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.3
Polychromatic	26.0 ± 3.2	25.6 ± 3.3	26.2 ± 3.3	29.3 ± 4.7
Orthochromatic	6.3 ± 1.7	5.5 ± 1.0	5.9 ± 1.4	6.5 ± 1.8
Myelocytic cells				
Myeloblast	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Promyelocyte	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2
Myelocyte	1.7 ± 0.6	1.8 ± 0.6	2.1 ± 0.3	1.7 ± 0.4
Metamyelocyte	7.9 ± 1.6	8.2 ± 1.7	8.0 ± 0.8	7.7 ± 1.3
Band form	20.3 ± 3.1	22.1 ± 1.7	22.8 ± 1.5	21.3 ± 2.6
Segmented form	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.5
Eosinophil	1.8 ± 0.3	1.9 ± 0.9	1.9 ± 0.4	2.2 ± 0.8
Basophil	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1
Other cells				
Lymphocyte	31.9 ± 5.6	30.8 ± 3.9	29.6 ± 4.6	27.4 ± 6.5
Transitional cell	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1
Monocyte	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
Megakaryocyte	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1
Plasma cell	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.2
Mast cell	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.2
Reticulum cell	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.4	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.3
Mitotic phase	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Others	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
M/E	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2

Mean±S.D.

No significant difference in any treated groups from 0 mg/kg group.

Table 3 Blood chemical examination of male rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	175	350	700
No. of animals	12	12	12	12
GOT (IU/L)	52 ± 7	54 ± 12	54 ± 13	60 ± 22
GPT (IU/L)	44 ± 5	44 ± 7	42 ± 6	48 ± 13
LDH (IU/L)	36 ± 9	36 ± 12	37 ± 9	37 ± 12
AIP (IU/L)	201 ± 46	206 ± 54	218 ± 46	221 ± 41
Total chol. (mg/dL)	63 ± 10	58 ± 10	64 ± 14	66 ± 13
TG (mg/dL)	52 ± 16	58 ± 19	61 ± 21	66 ± 23
PL (mg/dL)	104 ± 17	96 ± 14	103 ± 17	109 ± 18
Total bilirubin (mg/dL)	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.02
Glucose (mg/dL)	154 ± 14	145 ± 16	146 ± 13	145 ± 20
BUN (mg/dL)	16 ± 1	16 ± 3	16 ± 2	15 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.62 ± 0.04	0.62 ± 0.03	0.65 ± 0.05	0.60 ± 0.03
Na (mEq/L)	143 ± 1	144 ± 1	143 ± 1	144 ± 1
K (mEq/L)	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.3
Cl (mEq/L)	109 ± 2	109 ± 2	109 ± 2	109 ± 2
Ca (mg/dL)	9.5 ± 0.3	9.5 ± 0.3	9.3 ± 0.2	9.4 ± 0.3
P (mg/dL)	7.5 ± 0.6	7.7 ± 0.7	7.8 ± 0.6	8.2 ± 0.8
Fe (μg/dL)	104 ± 43	102 ± 40	107 ± 52	159* ± 58
TIBC (μg/dL)	504 ± 37	500 ± 44	501 ± 32	535 ± 60
UIBC (μg/dL)	400 ± 54	398 ± 62	394 ± 56	377 ± 76
TP (g/dL)	6.3 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.3	5.9** ± 0.4
A/G ratio	0.79 ± 0.04	0.75 ± 0.06	0.77 ± 0.06	0.79 ± 0.06
Albumin (%)	44.0 ± 1.3	42.8 ± 2.0	43.4 ± 1.8	44.1 ± 1.7
Globulin (%)				
α <sub>1</sub>	22.4 ± 1.2	23.6 ± 1.5	22.7 ± 1.9	20.5* ± 2.3
α <sub>2</sub>	10.0 ± 0.7	9.9 ± 0.8	9.9 ± 0.7	10.5 ± 0.9
β	17.8 ± 1.2	18.3 ± 0.8	18.4 ± 1.1	19.0 ± 1.0
γ	5.7 ± 0.6	5.4 ± 0.7	5.6 ± 0.7	5.9 ± 1.1

Significantly different from the 0 mg/kg group; \*:P&lt;0.05, \*\*:P&lt;0.01

Table 4 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	175	350	700
No. of animals	12	12	12	12
Body weight (g)	486 ± 24	481 ± 22	480 ± 38	424** ± 54
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	350 ± 65	326 ± 57	345 ± 78	273 ± 90
Heart (g)	1.44 ± 0.15	1.45 ± 0.12	1.38 ± 0.12	1.33 ± 0.13
Liver (g)	14.08 ± 1.19	14.01 ± 1.35	13.77 ± 1.95	12.29* ± 2.17
Spleen (g)	0.77 ± 0.09	0.77 ± 0.09	0.73 ± 0.17	0.71 ± 0.16
Kidney (g)	right	1.65 ± 0.13	1.69 ± 0.13	1.60 ± 0.13
	left	1.69 ± 0.14	1.72 ± 0.15	1.61 ± 0.15
	total	3.34 ± 0.24	3.41 ± 0.27	3.22 ± 0.28
Testis (g)	right	1.67 ± 0.11	1.69 ± 0.11	1.68 ± 0.11
	left	1.69 ± 0.11	1.66 ± 0.11	1.66 ± 0.10
	total	3.36 ± 0.22	3.35 ± 0.21	3.34 ± 0.20
Epididymis (mg)	right	629 ± 46	631 ± 42	618 ± 48
	left	634 ± 89	617 ± 46	611 ± 29
	total	1263 ± 133	1248 ± 87	1229 ± 73
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	72 ± 13	68 ± 12	73 ± 19	63 ± 16
Heart (g%)	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.03
Liver (g%)	2.90 ± 0.17	2.91 ± 0.17	2.86 ± 0.25	2.89 ± 0.19
Spleen (g%)	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.16 ± 0.02
Kidney (g%)	right	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.03
	left	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.02
	total	0.69 ± 0.05	0.71 ± 0.05	0.67 ± 0.06
Testis (g%)	right	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.03
	left	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.04
	total	0.69 ± 0.06	0.70 ± 0.05	0.70 ± 0.07
Epididymis (mg%)	right	130 ± 12	132 ± 10	129 ± 11
	left	131 ± 20	129 ± 12	128 ± 11
	total	261 ± 31	260 ± 22	257 ± 22

Values are expressed as Mean±S.D.  
Significantly different from the 0 mg/kg group; \*:P<0.05,\*\*:P<0.01



Table 5 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	175	350	700
No. of animals	10	12	11	9
Body weight (g)	352 ± 35	366 ± 24	361 ± 21	336 ± 40
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	224 ± 77	244 ± 48	237 ± 75	218 ± 67
Heart (g)	1.03 ± 0.07	1.08 ± 0.07	1.06 ± 0.07	1.04 ± 0.11
Liver (g)	14.47 ± 1.78	15.89 ± 1.26	15.81 ± 0.93	14.81 ± 2.37
Spleen (g)	0.65 ± 0.12	0.70 ± 0.12	0.71 ± 0.09	0.64 ± 0.11
Kidney (g)	right	1.17 ± 0.08	1.22 ± 0.06	1.26 ± 0.12
	left	1.17 ± 0.09	1.22 ± 0.07	1.27 ± 0.11
	total	2.34 ± 0.16	2.44 ± 0.12	2.52 ± 0.21
Ovary (mg)	right	57.0 ± 9.5	58.7 ± 4.6	56.6 ± 6.7
	left	53.0 ± 8.6	56.9 ± 10.9	59.4 ± 9.4
	total	110.0 ± 12.2	115.7 ± 13.0	116.0 ± 12.7
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	64 ± 21	67 ± 12	66 ± 20	64 ± 15
Heart (g%)	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.31* ± 0.01
Liver (g%)	4.11 ± 0.20	4.35 ± 0.30	4.38 ± 0.22	4.39 ± 0.44
Spleen (g%)	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.02
Kidney (g%)	right	0.33 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.03
	left	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.02
	total	0.67 ± 0.07	0.67 ± 0.04	0.70 ± 0.04
Ovary (mg%)	right	16.4 ± 3.2	16.1 ± 1.8	15.7 ± 1.5
	left	15.1 ± 2.4	15.6 ± 2.9	16.5 ± 2.4
	total	31.5 ± 4.3	31.7 ± 3.9	32.1 ± 2.9

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from the 0 mg/kg group; \*:P<0.05

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 6 Histopathological findings of male rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs	Dose (mg/kg/day)	0					175					350					700								
		No. of animals					12					12					12								
-findings	Grading	0	1	2	3	NoL	TE	0	1	2	3	NoL	TE	0	1	2	3	NoL	TE	0	1	2	3	NoL	TE
Cerebrum		12				0	12					0							0	12				0	12
Cerebellum		12				0	12					0							0	12				0	12
Heart																									
-myocardial degeneration																									
/fibrosis		12				0	12					0			0	10	2						2	12	
Liver																									
-microgranuloma		7	5			5	12					0			0	9	2	1					3	12	
Adrenal		12				0	12					0			0	12							0	12	
Spleen																									
-hematopoiesis,																									
extramedullary			11	1		12	12					0			0		11	1					12	12	
-deposit, brown																									
pigment, red pulp			12			12	12					0			0		12						12	12	
Kidney																									
-fibrosis, cortical, focal		11			1	1	12					0			0	12							0	12	
-basophilic tubule		10	1	1		2	12					0			0	12							0	12	
-eosinophilic body,																									
tubular epithelium		11		1		1	12					0			0	12							0	12	
Testis		12				0	12					0			0	12							0	12	
Epididymis																									
-granuloma, spermatic		11		1		1	12					0			0	12							0	12	
Other gross lesion																									
Stomach																									
-hyperplasia, mucosa,																									
limiting ridge		12				0	12	12			0	12	3	8	1	9	12**	1	6	5			11	12**	
-atrophy, mucosa,																									
cardiac region		12				0	12	12			0	12	3	6	3	9	12**		3	9			12	12**	
-erosion																									
(including healed erosion),																									
glandular stomach		12				0	12	12			0	12	12			0	12	6	1	3	2	6	12*		
-hemorrhage, superficial,																									
glandular stomach		12				0	12	12			0	12	12			0	12	7	3	2		5	12		

0: No remarkable changes 1: Slight 2: Mild 3: Moderate NoL: Numbers with lesion  
 TE: Total Examined  
 Significantly different from the 0 mg/kg group; \*: P<0.05, \*\*P<0.01

Table 7 Histopathological findings of female rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs -findings	Dose (mg/kg/day) No. of animals Grading	0				175				350				700							
		0	1	2	3	NoL	TE	0	1	2	3	NoL	TE	0	1	2	3	NoL	TE		
Cerebrum	12				0	12				0				0	10				0	10	
Cerebellum	12				0	12				0				0	10				0	10	
Heart																					
-myocardial degeneration /fibrosis	11		1		1	12				0				0	9		1		1	10	
Liver																					
-microgranuloma	11	1			1	12				0				0	9	1			1	10	
-hematopoiesis, extramedullary	10	2			2	12				0				0	8	2			2	10	
Adrenal	12				0	12				0				0	10				0	10	
Spleen																					
-hematopoiesis, extramedullary		6	6		12	12				0				0		3	7		10	10	
-deposit, brown pigment, red pulp		9	3		12	12				0				0		9	1		10	10	
Kidney	12				0	12				0				0	10				0	10	
Ovary	12				0	12				0				0	10				0	10	
Stomach																					
-hyperplasia, mucosa, limiting ridge	12				0	12	12			0	12	8	2	1	3	11(1)	3	1	6	7	10**
-atrophy, mucosa, cardiac region	12				0	12	12			0	12	8	3		3	11(1)		2	8	10	10**
-erosion (including healed erosion), glandular stomach	12				0	12	12			0	12	11			11(1)	5	2	3		5	10
-hemorrhage, superficial, glandular stomach	12				0	12	12			0	12	11			11(1)	9		1		1	10
-hyperplasia, mucosa, forestomach, focal	12				0	12	12			0	12	10	1		1	11(1)	10			0	10

0: No remarkable changes 1: Slight 2: Mild 3: Moderate NoL: Numbers with lesion

TE: Total Examined

( ): Number of lost specimens

Significantly different from the 0 mg/kg group; \*: P&lt;0.01

Table 8 Summary of reproductive performance of female rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	175	350	700
Estrus cycle (days, Mean±S.D.)	4.2 ± 0.5	4.8 ± 2.0	4.3 ± 0.4	4.3 ± 0.4
No. of pairs mated	12	12	12	11
No. of pairs copulated	12	12	12	11
No. of pregnant females	10	12	11	10
Copulation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	83.3	100.0	91.7	90.9

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

b) : (No. of pregnant females/No. of pairs copulated)×100

Table 9 Delivery and litter data of female rats treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	175	350	700
No. of pregnant females	10	12	11	9
No. of females with live pups	10	12	11	9
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length (days, Mean±S.D.)	22.7 ± 0.5	22.7 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.3 ± 0.5
No. of corpora lutea (Mean±S.D.)	185(18.5 ± 2.4)	226(18.8 ± 1.6)	214(19.5 ± 2.0)	163(18.1 ± 2.7)
No. of implantations (Mean±S.D.)	180(18.0 ± 2.7)	212(17.7 ± 1.7)	206(18.7 ± 1.8)	161(17.9 ± 2.8)
Implantation index (%) <sup>b)</sup>	97.1	94.1	96.3	98.8
No. of stillborn (Mean±S.D.)	1(0.1 ± 0.3)	1(0.1 ± 0.3)	1(0.1 ± 0.3)	0(0.0 ± 0.0)
No. of live born (Mean±S.D.)	155(15.5 ± 4.7)	187(15.6 ± 2.0)	193(17.5 ± 1.6)	147(16.3 ± 2.6)
Live birth index (%) <sup>c)</sup>	99.6	99.5	99.5	100.0
Delivery index (%) <sup>d)</sup>	85.5	88.8	94.5	91.5
No. of male pups (Mean±S.D.)	78(7.8 ± 3.0)	91(7.6 ± 2.7)	94(8.5 ± 1.3)	69(7.7 ± 1.9)
No. of female pups (Mean±S.D.)	77(7.7 ± 4.0)	96(8.0 ± 2.7)	99(9.0 ± 1.5)	78(8.7 ± 2.6)
Sex ratio <sup>e)</sup>	1.01	0.95	0.95	0.88
No. of live pups (Mean±S.D.)				
Day 0 of lactation	155(15.5 ± 4.7)	187(15.6 ± 2.0)	193(17.5 ± 1.6)	147(16.3 ± 2.6)
Day 4 of lactation	153(15.3 ± 4.5)	184(15.3 ± 2.3)	187(17.0 ± 1.5)	128(14.2 ± 5.6)
Viability index (%) <sup>f)</sup>	99.0	98.2	97.0	85.9

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

b) : (No. of implantations/No. of copora lutea)×100

c) : (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100

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

e) : No. of male pups/No. of female pups

f) : (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100

Table 10 Body weight of pups from dams treated orally with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	175	350	700
Day 0 of lactation				
No. of dams	10	12	11	9
Male (g)	7.2 ± 0.8	7.2 ± 0.7	7.0 ± 0.5	6.7 ± 0.3
Female (g)	6.9 ± 0.7	6.8 ± 0.6	6.7 ± 0.5	6.3 ± 0.4
Day 4 of lactation				
No. of dams	10	12	11	9
Male (g)	11.3 ± 2.7	11.1 ± 1.2	10.7 ± 0.8	10.0 ± 2.3
Female (g)	10.8 ± 2.2	10.5 ± 0.8	10.1 ± 0.7	9.5 ± 2.2