

2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸ナトリウムの
ラットにおける28日間反復投与毒性試験

－最終報告書－

試験実施施設 : 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所

目 次

頁

要 約	-----	1
緒 言	-----	2
試験材料及び方法	-----	2
試験成績	-----	6
考 察	-----	9
 Fig. 1	Mean body weight changes in male rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period	11
Fig. 2	Mean body weight changes in female rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period	12
Fig. 3	Mean food consumption in male rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period	13
Fig. 4	Mean food consumption in female rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period	14
Table 1	Clinical signs in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period	15
Table 2	Body weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period	17
Table 3	Food consumption in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period	19

	頁
Table 4 Urinary findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days -----	20
Table 5 Urinary findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period -----	24
Table 6 Hematological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days -----	28
Table 7 Hematological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period -----	31
Table 8 Biochemical findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days -----	34
Table 9 Biochemical findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period -----	37
Table 10 Necropsy findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days -----	40
Table 11 Necropsy findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period -----	41
Table 12 Organ weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days -----	42
Table 13 Organ weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period -----	45
Table 14A Histopathological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days -----	48
Table 14B Histopathological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days -----	49

要 約

2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸ナトリウムの安全性に関する毒性試験の一環として、本被験物質を0(対照), 100, 300及び1000 mg/kgの用量で1群雌雄各6匹のCrj:CD(SD系)ラットに28日間反復経口投与する毒性試験を実施し、以下の結果を得た。なお、対照群及び1000 mg/kg群にはそれぞれ雌雄各6匹の14日間回復群も設けた。

死亡はいずれの群にもみられなかった。一般状態の観察では、1000 mg/kg群の雌雄において、投与期間の初期に散瞳が認められた。本症状は投与後約30分に観察され、4時間後には消失する変化であった。

体重、摂餌量、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び病理学的検査では、被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

回復試験では、いずれの検査においても変化は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下での無影響量は雌雄とも300 mg/kgと考えられた。

緒 言

2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸ナトリウムの安全性に関する毒性試験の一環として、本被験物質を雌雄ラットに28日間反復経口投与するとともに、投与期間終了後に14日間の休薬期間を設けて、その毒性及び回復性について検討したので報告する。

試験材料及び方法

1. 被験物質

より提供された2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸ナトリウム(Lot No.)を試験に使用した。本被験物質は純度96.4%，分子量348.26の灰白色の粉末でない(添付資料1-1)。試験期間中の被験物質の安定性については、投与期間終了後に残余の被験物質を上記の供給源にて分析することにより確認した(添付資料1-2)。媒体には日本薬局方 注射用水(株式会社 大塚製薬工場, Lot No. 6B70)を使用した。なお、被験物質は室温、遮光下で、注射用水は室温でそれぞれ被験物質室の保管庫に保管した。

2. 使用動物及び飼育条件

4週齢のCrj:CD(SD系)ラット(日本チャールス・リバー株式会社)を雌雄各42匹購入し、10日間の検疫馴化を行った。この間に、全例について一般状態の観察及び体重測定を実施するとともに、雌雄各3匹を抜粋して剖検し、異常がないことを確認したのち、雌雄各36匹を選んで6週齢で試験に使用した。投与開始時の体重は、雄が189.3~220.2 g, 雌が144.7~170.8 gであった。動物は、温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (許容範囲 $21\sim 27^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55 \pm 10\%$ (許容範囲 $35\sim 75\%$)、照明12時間(午前7時~午後7時)及び換気回数13~15回/時に設定したバリアーシステム飼育室(94番)でステンレススチール製ハンガーケージ(W260×H200×D380 mm)に個別に収容して飼育した。なお、試験期間中の温度の実測値は最高 25°C 、最低 23°C 、湿度の実測値は最高57%，最低52%であった。飼料は高圧蒸気滅菌処理した固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業株式会社)を、飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加(約2 ppm)した井戸水を自動給水装置によりそれぞれ自由に摂取させた。飼料については財團法人 日本食品分析センターにて、また、飲水については株式会社鶴城 南

九科研センターにて分析を行い、いずれも許容基準に適合していることを確認した。飼育器材は高圧蒸気滅菌したものを使用し、ケージは2週間に1回以上、受皿は週3回以上、ラックは4週間に1回以上交換するとともに、飼育室は毎日清掃し、消毒薬を浸したモップで清拭した。

3. 試験群構成、投与量設定の根拠及び群分け

試験群構成を下表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	性別	使用動物数	動物番号
対照群	0	♂	6 + 6 *	201～206, 207*～212*
		♀	6 + 6 *	251～256, 257*～262*
低用量群	100	♂	6	213～218
		♀	6	263～268
中間用量群	300	♂	6	219～224
		♀	6	269～274
高用量群	1000	♂	6 + 6 *	225～230, 231*～236*
		♀	6 + 6 *	275～280, 281*～286*

* : 回復試験に使用した動物

投与量は、先に当研究所で実施した2週間反復投与毒性予備試験(投与量: 0, 100, 300及び1000 mg/kg)の結果から設定した。すなわち、当該試験では、1000 mg/kg群の雌雄で散瞳が認められた。したがって、本試験では、予備試験と同様に1000 mg/kgを高用量とし、以下公比約3で除した300及び100 mg/kgを設定した。

試験群は、上記3用量に対照を加え計4群とした。1群当たりの動物数は、投与期間終了時の剖検例として各群とも雌雄各6匹とし、更に、対照群及び高用量群については回復期間終了時の剖検例として雌雄各6匹を設けた。

群分けは、投与開始前日に当日の体重を基に層別連続無作為化法で行い、群分け後の動物には動物番号を刻印した耳標を取り付けて個体識別した。また、各ケージには試験番号、動物番号、投与量及び性別を表示したラベルを付けて識別した。

4. 投与経路、投与方法、投与期間及び回復期間

投与経路は、化審法ガイドラインで指定されており、また、予想されるヒトへの曝露経路の一つである経口投与とした。投与には胃管を用い、1日1回投与で28日間反復投与した。投与容量は10 ml/kgとし、個体ごとの投与液量は最新の体重を基に算出した。対照群には注射用水を同様に投与した。

回復試験に供した動物は、投与期間終了後に14日間無処置で飼育した。

5. 被験物質と媒体との混合物調製法

被験物質を各濃度ごとに必要量秤量し、注射用水に溶解させ、1.0, 3.0及び10.0 W/V %溶液を調製した。調製は週1又は2回の頻度で行い、調製した投与液は褐色容器に入れて飼育区域内の検体保管室の保管庫にて室温保管した。また、初回調製時に、各濃度の投与液について被験物質の濃度確認を実施し、設定濃度の許容範囲(± 5 %以内)にあることを確認した(添付資料2)。なお、本調製法による0.1~20 W/V%溶液は、褐色容器中で室温保存下8日間安定であることが確認されている(添付資料3)。

6. 観察、検査、分析及び測定の頻度及び方法

1) 一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定

投与期間中は毎日投与前、投与後約30分まで及び投与後約4時間に、回復期間中は毎日午前及び午後に一般状態及び死亡の有無を観察した。また、体重及び摂餌量を投与期間及び回復期間を通して週2回の頻度で測定し、更に、体重は投与開始日の投与前及び剖検日にも測定した。

2) 尿検査

投与4週目及び回復2週目に、すべての動物を代謝ケージに個別収容し、絶食、給水下で午前8時から12時までの時間帯に採取した新鮮尿について、比色試験紙(プレテスト8a、和光純薬工業株式会社)を用いてpH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血及びウロビリノーゲンを検査した。更に、新鮮尿は1500回転/分で5分間遠心分離し、得られた尿沈渣について鏡検した。また、新鮮尿採取後に給餌、給水下で採取した24時間蓄積尿について、尿量、色調、浸透圧(冰点降下法; OSMOMETER OM801、VOGEL社)及び比重(屈折率法; 尿屈折計、株式会社アタゴ)を測定した。

3) 血液学的検査

投与期間終了後及び回復期間終了後に、すべての動物を18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム30 mg/kgを腹腔内投与して麻酔し、開腹後、腹部大静脈から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2K処理(EDTA-2K加血液)して多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780, 東亜医用電子株式会社)を用いて、白血球数(電気抵抗検出方式), 赤血球数(電気抵抗検出方式), ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法), ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)及び血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、赤血球数, ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の測定結果を基にWintrobeの赤血球恒数〔平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球血色素量(MCH)及び平均赤血球血色素濃度(MCHC)〕を算出した。更に、血液の一部は塗抹標本とし、May-Grünwald-Giemsa染色を施して白血球百分比を算出するとともに、網状赤血球率検査用のニューメチレンブルー超生体染色標本を作製して保管した。また、3.8%クエン酸ナトリウム加血液を3000回転／分で15分間遠心分離し、得られた血漿を用いて全自动血液凝固測定装置(Sysmex CA-5000, 東亜医用電子株式会社)により、プロトロンビン時間(散乱光検出方式)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT, 散乱光検出方式)を測定した。

4) 血液生化学的検査

血液学的検査と同時に採取したすべての動物の血液を室温で約60分間放置後、3000回転／分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(736-10, 株式会社 日立製作所)により、総蛋白質(T.protein, ビウレット法), アルブミン(BCG法), A/G比(総蛋白質及びアルブミンより算出), 総ビリルビン(T.bilirubin, アルカリアゾビリルビン法), GOT(Karmen法), GPT(Wróblewski-La Due法), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP, L- γ -グルタミル-DBHA基質法), アルカリ性 fosfアターゼ(ALP, p-ニトロフェニルリン酸基質法), コリンエステラーゼ(ヨウ化ブチリルチオコリン基質法), アセチルコリンエステラーゼ(アセチルコリン基質法), 総コレステロール(T.cholesterol, COD-DAOS法), トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法), リン脂質(酵素法・DAOS発色法), グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法), 尿素窒素(BUN, ウレアーゼ-G β DH法), クレアチニン(Jaffé法), 無機リン(IP, モリブデン酸直接法)及びカルシウム(Ca, OCPC法)を測定した。また、電解質分析装

置(PVA- α III, 株式会社 アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(Na, 電極法), カリウム(K, 電極法)及びクロール(Cl, 電量滴定法)を測定した。

5) 剖検, 器官重量の測定及び病理組織学的検査

投与期間終了後及び回復期間終了後に, すべての動物について採血を行ったのち, 外側腸骨動脈を切断して放血死させ, 解剖して諸器官及び組織の肉眼的観察を行った。剖検後, 脳, 心臓, 肺(気管支を含む), 胸腺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣及び卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに, 剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。重量測定器官に加え, 下垂体, 脊髄, 眼球, 甲状腺(上皮小体を含む), 脾臓, 胃, 膀胱, 大腿骨(骨髄を含む)及び肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。なお, 10%中性緩衝ホルマリン溶液による固定に先だって, 眼球は2.5%グルタールアルデヒド溶液で, また, 精巣はブアン液でそれぞれ前固定した。投与期間終了時の対照群及び高用量群の心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎及びすべての肉眼的異常部位については, 常法に従ってパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリソ・エオジン(HE)染色を施して光学顕微鏡下で観察した。

7. 統計学的処理

体重, 摂餌量, 尿検査(定性反応は除く), 血液学的検査, 血液生化学的検査, 器官重量及び体重比器官重量について, 各群ごとに平均値と標準偏差を求め, Bartlett法により分散の均一性を検定した。分散が均一な場合はDunnettの多重比較検定を用いて, 分散が不均一な場合はSteelの多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。なお, いずれの場合も有意水準は5%とした。ただし, 病理組織学的検査については, 偶発的変化が散見された程度であったため, 統計学的処理は行わなかった。

試験成績

1. 一般状態

一般状態の観察結果をTable 1並びにAppendix 1及び2に示した。

すべての群で死亡例はみられなかった。

1000 mg/kg群では, 投与後約30分の観察で散瞳が認められた。散瞳は, 雄で投与初日

から投与15日まで、雌で投与初日から投与8日まで連日あるいは散発的にみられた。発現例数の総数は雄で3例、雌で4例であった。しかし、いずれも投与後約4時間の観察時には消失していた。このほか、100 mg/kg群の雄1例で投与27日から左耳介付近の頸部皮膚に外傷が、対照群の雌1例で投与12日から右眼に眼内出血がいずれも投与期間終了時までみられたが、他の群にはみられておらず、偶発的変化と考えられた。

回復期間においては、1000 mg/kg群の雌雄では変化は認められなかった。

2. 体重

体重推移をFig. 1及び2、Table 2並びにAppendix 3及び4に示した。

投与期間又は回復期間を通して、各被験物質投与群は対照群とほぼ同様な推移を示した。

3. 摂餌量

摂餌量をFig. 3及び4、Table 3並びにAppendix 5及び6に示した。

300 mg/kg群の雄で、投与24日にごく軽度の増加がみられたが、一過性であること及び1000 mg/kg群には変化は見られていないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。回復期間では、1000 mg/kg群は対照群とほぼ同様な推移を示した。

4. 尿検査

投与4週目の検査結果をTable 4及びAppendix 7及び8に、回復2週目の検査結果をTable 5及びAppendix 9及び10に示した。

投与4週目の検査では、300 mg/kg群の雄で尿量の増加が認められ、浸透圧及び比重の減少も認められた。また、浸透圧の減少は100 mg/kg群の雄にもみられたが、同群の雌及び1000 mg/kg群では変化はみられなかったことから、上記の変化には毒性学的意義はないと考えられた。

回復2週目の検査では、1000 mg/kg群の雌雄で変化は認められなかった。

5. 血液学的検査

投与期間終了時の検査結果をTable 6並びにAppendix 11及び12に、回復期間終了時の検査結果をTable 7並びにAppendix 13及び14に示した。

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg以上の群の雄でMCVの増加及び1000 mg/kg群の雄でMCHCの減少が認められたが、いずれも生理学的な変動範囲内(下表)の変化であり、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値には変化は認められなかったことから、毒性学的に意義のない変化と考えられた。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌雄で変化は認められなかった。

10週齢Crj:CD(SD)ラットの背景データ

性 項 目	動物数	平均値	標準偏差	最小値	最大値
雄 MCV(f1)	78	59	3	52	64
雄 MCHC(%)	78	31.5	0.6	30.1	32.8

6. 血液生化学的検査

投与期間終了時の検査結果をTable 8並びにAppendix 15及び16に、回復期間終了時の検査結果をTable 9並びにAppendix 17及び18に示した。

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg群の雌でリン脂質の減少が、100 mg/kg群の雄でカルシウムの減少が認められたが、300及び1000 mg/kg群にはみられなかつたことから、毒性学的に意義のない変化と判断した。また、100 mg/kg以上の群の雄でナトリウムの減少が認められたが、いずれも生理学的な変動範囲内(下表)の変化であった。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌でA/G比及びトリグリセライドの増加が認められたが、投与期間終了時には認められておらず、またいすれも生理学的な変動範囲内(下表)の変化であった。

10週齢Crj:CD(SD)ラットの背景データ

性 項 目	動物数	平均値	標準偏差	最小値	最大値
雄 Na(meq/l)	78	146.8	1.4	143.3	150.5

12週齢Crj:CD(SD)ラットの背景データ

性 項 目	動物数	平均値	標準偏差	最小値	最大値
雌 A/G比	54	2.58	0.39	2.00	3.82
雌 トリグリセライド(mg/dl)	54	22	18	9	141

7. 剖検

投与期間終了時の検査結果をTable 10並びにAppendix 19及び20に、回復期間終了時の検査結果をTable 11並びにAppendix 21に示した。

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雄1例で肺の暗赤色点が、100 mg/kg群の雄1例で左耳介付近の頸部皮膚に外傷が認められた。また、対照群の雌1例で両眼球に暗赤色点(右でやや強い)が認められた。

回復期間終了時の検査では、対照群及び1000 mg/kg群ともに変化は認められなかった。

8. 器官重量

投与期間終了時の検査結果をTable 12並びにAppendix 22及び23に、回復期間終了時の検査結果をTable 13並びにAppendix 24及び25に示した。

投与期間終了時の検査では、300 mg/kg群の雄で胸腺の絶対及び相対重量の増加が認められたが、同群の雌及び1000 mg/kg群では変化はみられていないことから毒性学的意義はないと思われた。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌で副腎の相対重量の減少が認められた。

9. 病理組織学的検査

投与期間終了時の検査結果をTable 14A(グレード別出現例数)及びTable 14B(総出現例数)並びにAppendix 26及び27に示した。

投与期間終了時の剖検例において、組織学的变化は肉眼的変化に一致して認められた。すなわち、肺では、限局性の出血及び細胞浸潤が1000 mg/kg群の雄1例に、眼球では、両側性の硝子体内出血が対照群の雌1例に認められた。また、頸部皮膚のびらんが100 mg/kg群の雄1例に認められた。

考 察

ナフトールジスルホン酸には数種類の異性体が存在するが、そのいずれについても哺乳動物を用いた毒性試験は報告されていない。今回、2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸ナトリウムの安全性に関する毒性試験の一環として、本被験物質の0, 100, 300及び1000 mg/kgを雌雄ラットに28日間反復経口投与し、その毒性及び回復性について検討した。

いずれの群でも死亡例は認められなかつた。一般状態の観察では、1000 mg/kg群の雌雄で散瞳が認められ、被験物質投与に関連した変化と考えられた。本症状は、雄で投与初日から投与15日まで、雌で投与初日から投与8日まで連日あるいは散発的にみられたが、投与後4時間には消失する変化であった。

体重、摂餌量、尿検査、血液学的検査及び血液生化学的検査では、被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかつた。

病理学的検査では、剖検で投与期間終了時にごく少数例の肺、眼球あるいは耳介付近の頸部皮膚に肉眼的変化がみられ、組織学的にも相応する変化がみられたが、これら以外には器官重量を含む病理学的検査でまったく変化はみられなかつた。

回復試験では、1000 mg/kg群の雌で副腎相対重量の減少が認められたが、投与期間終了時の検査では重量変化及び組織学的变化はみられなかつたことから、毒性学的意義はないと思われた。また、その他の諸検査あるいは測定においては、雌雄のいずれにも変化はみられなかつた。

以上のように、本試験では1000 mg/kg群で散瞳が認められたことから、無影響量は雌雄とも300 mg/kgと考えられた。

Study No.29633

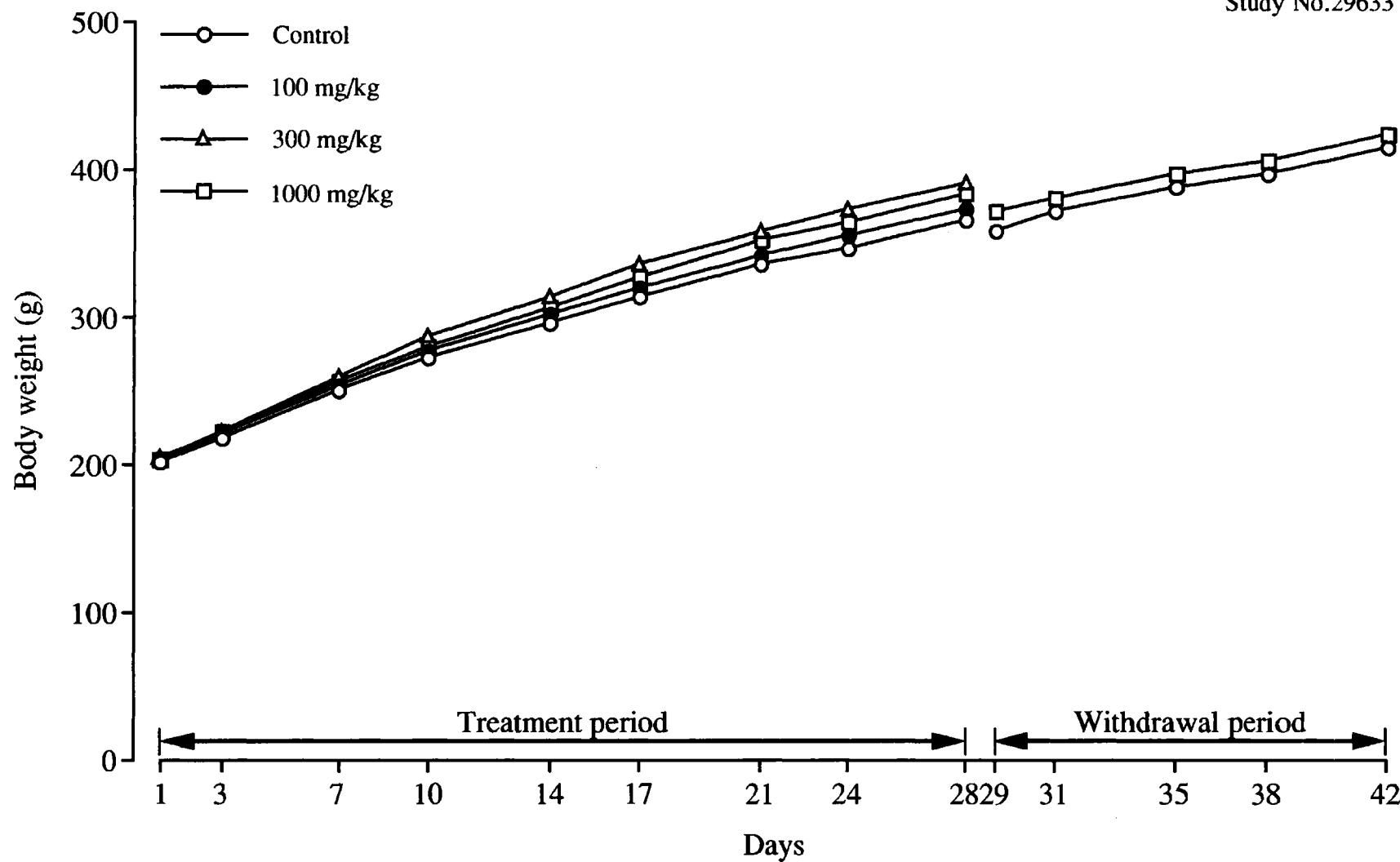


Fig.1 Mean body weight changes in male rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

Study No.29633

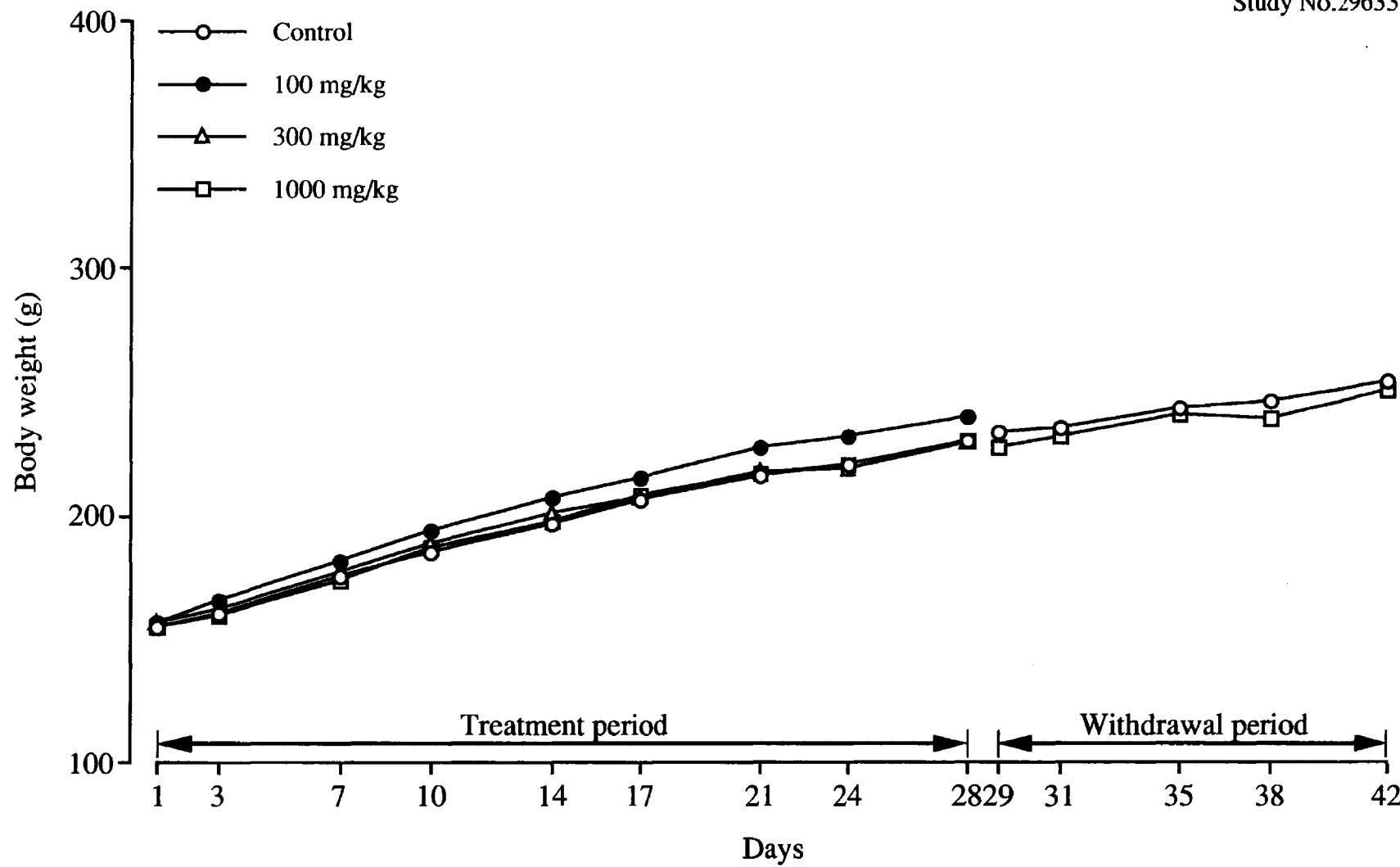


Fig.2 Mean body weight changes in female rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

Study No.29633

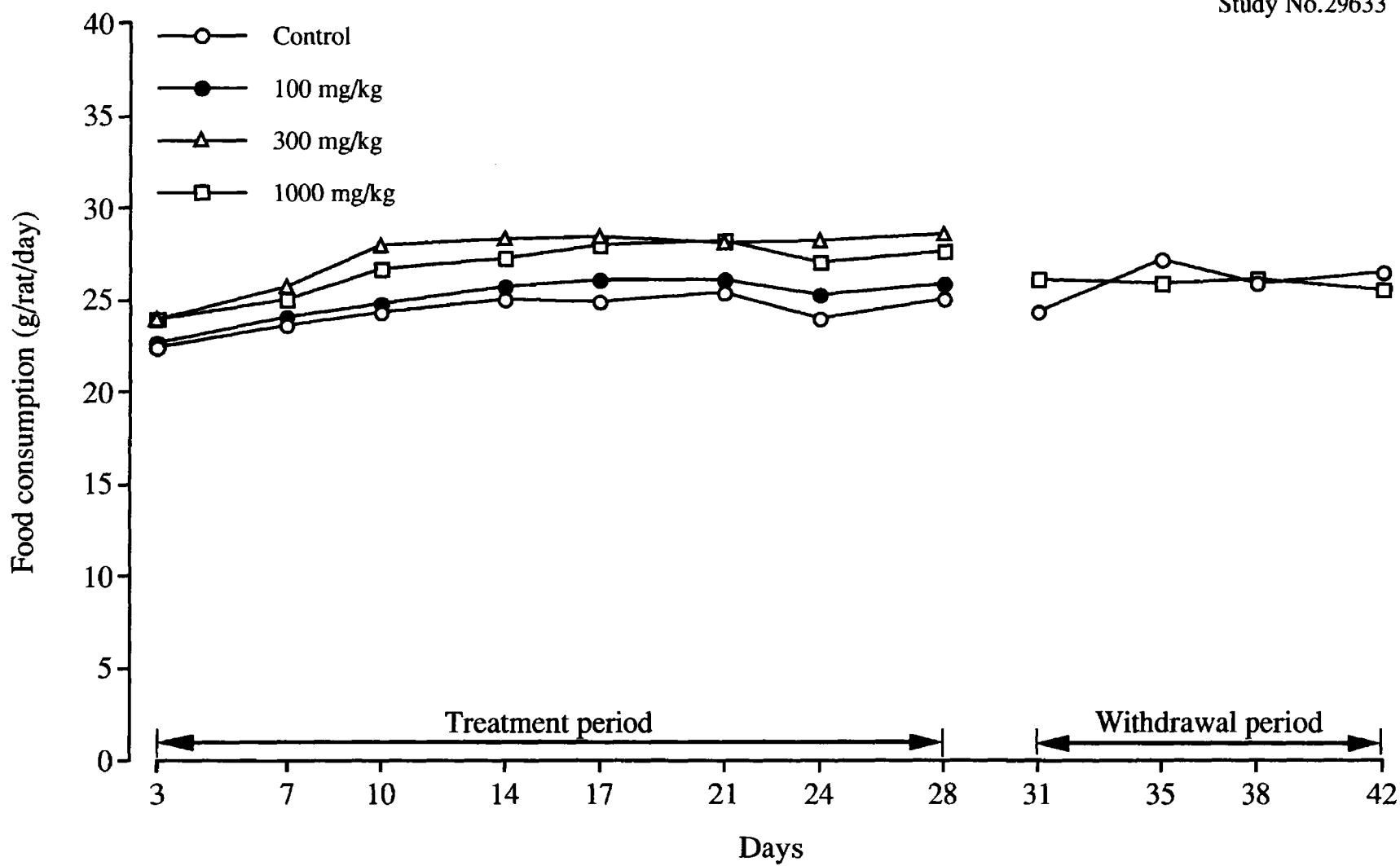


Fig.3 Mean food consumption in male rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

Study No.29633

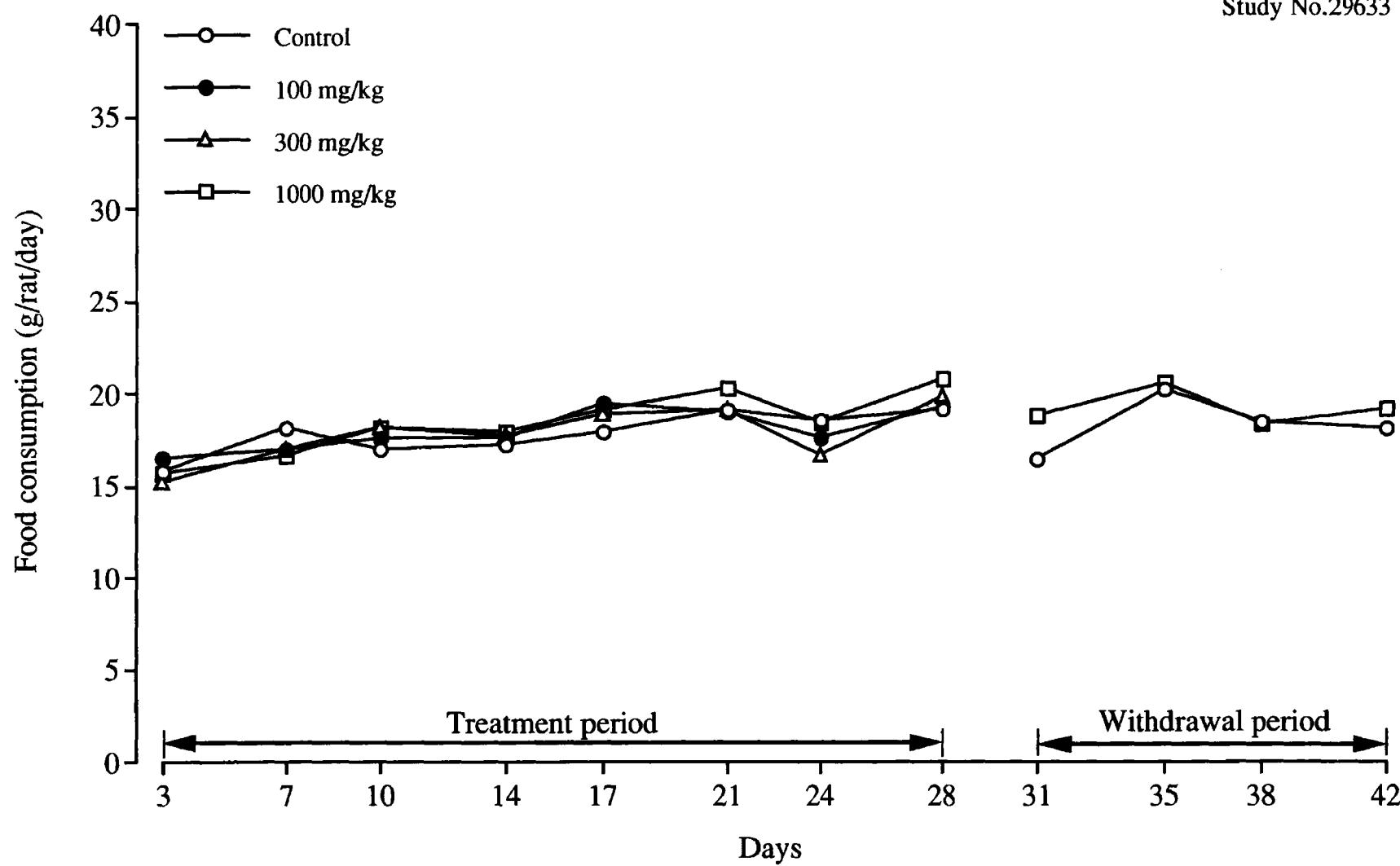


Fig.4 Mean food consumption in female rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

Table 1 Clinical signs in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Table 1 - continued Clinical signs in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Table 2 Body weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Body weight (g) on day												
		1	3	7	10	14	17	21	24	28	31	35		
Male	Control	N Mean S.D.	12 202.0 ±9.0	12 217.7 ±11.1	12 249.6 ±14.3	12 272.2 ±17.7	12 296.0 ±21.9	12 312.9 ±27.6	12 335.6 ±31.3	12 345.4 ±34.1	12 364.7 ±35.7	6 357.7 ±42.0	6 370.5 ±44.7	6 386.1 ±43.6
	100mg/kg	N Mean S.D.	6 202.4 ±10.3	6 220.9 ±11.7	6 252.7 ±13.4	6 276.9 ±14.6	6 301.2 ±17.2	6 319.5 ±22.0	6 340.8 ±25.5	6 354.0 ±26.6	6 372.1 ±29.1			
	300mg/kg	N Mean S.D.	6 205.0 ±9.0	6 222.2 ±9.7	6 259.6 ±14.7	6 286.7 ±21.6	6 313.6 ±24.9	6 335.3 ±27.8	6 356.8 ±33.4	6 371.6 ±35.2	6 390.4 ±38.7			
	1000mg/kg	N Mean S.D.	12 203.1 ±9.4	12 221.6 ±12.1	12 255.8 ±14.8	12 279.5 ±18.6	12 306.4 ±22.8	12 325.9 ±26.9	12 351.0 ±30.5	12 362.8 ±30.7	12 382.2 ±34.5	6 370.0 ±39.1	6 379.6 ±37.4	6 395.5 ±41.6
Female	Control	N Mean S.D.	12 154.9 ±7.5	12 160.4 ±8.0	12 174.8 ±9.5	12 185.1 ±13.5	12 196.0 ±13.5	12 206.2 ±13.9	12 215.9 ±14.4	12 220.0 ±12.5	12 230.0 ±15.4	6 233.0 ±16.6	6 234.8 ±12.8	6 243.2 ±10.9
	100mg/kg	N Mean S.D.	6 156.9 ±8.5	6 165.2 ±9.5	6 181.7 ±10.8	6 193.7 ±13.9	6 207.2 ±14.8	6 214.9 ±14.8	6 227.0 ±16.9	6 231.5 ±16.9	6 239.5 ±15.7			
	300mg/kg	N Mean S.D.	6 156.8 ±7.9	6 162.1 ±9.9	6 177.2 ±10.7	6 188.2 ±9.5	6 200.4 ±10.7	6 206.5 ±10.8	6 217.3 ±12.0	6 218.5 ±14.8	6 229.1 ±15.2			
	1000mg/kg	N Mean S.D.	12 154.9 ±5.9	12 159.3 ±6.2	12 173.7 ±7.4	12 186.6 ±7.8	12 197.4 ±9.1	12 207.9 ±10.8	12 216.8 ±11.4	12 219.9 ±10.6	12 229.8 ±11.3	6 226.7 ±12.3	6 231.4 ±13.9	6 240.0 ±14.9

Not significantly different from control.

Table 2 - continued

Body weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Body weight (g) on day		
		38	42	43
Male	Control	N	6	6
		Mean	395.7	412.9
		S.D.	±45.0	±45.0
	100mg/kg	N	6	6
		Mean	380.2	380.2
		S.D.		
	300mg/kg	N	6	6
		Mean	380.2	380.2
		S.D.		
	1000mg/kg	N	6	6
		Mean	404.3	422.6
		S.D.	±40.6	±42.9
Female	Control	N	6	6
		Mean	245.5	253.4
		S.D.	±16.6	±19.0
	100mg/kg	N	6	6
		Mean	233.1	233.1
		S.D.	±14.7	
	300mg/kg	N	6	6
		Mean	233.1	233.1
		S.D.		
	1000mg/kg	N	6	6
		Mean	238.9	249.9
		S.D.	±13.3	±17.8
				231.7
				±15.7

Not significantly different from control.

Table 3 Food consumption in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Food consumption (g) on day												
		3	7	10	14	17	21	24	28	31	35	38	42	
Male	Control	N Mean S.D.	12 22.4 ±1.6	12 23.5 ±2.5	12 24.3 ±2.6	12 24.9 ±3.3	12 24.8 ±3.5	12 25.3 ±3.9	12 23.9 ±3.5	6 25.0 ±2.7	6 24.3 ±3.1	6 27.1 ±4.4	6 25.8 ±3.7	6 26.4 ±3.6
	100mg/kg	N Mean S.D.	6 22.6 ±1.6	6 24.0 ±2.4	6 24.7 ±2.7	6 25.7 ±3.5	6 26.0 ±2.8	6 26.0 ±3.7	6 25.2 ±2.4	6 25.8 ±3.8				
	300mg/kg	N Mean S.D.	6 23.9 ±2.1	6 25.6 ±1.7	6 27.9 ±3.8	6 28.2 ±3.2	6 28.3 ±3.9	6 28.0 ±3.6	6 28.1* ±3.5	6 28.5 ±3.6				
	1000mg/kg	N Mean S.D.	12 23.9 ±1.5	12 25.0 ±2.8	12 26.6 ±3.4	12 27.2 ±3.1	12 27.9 ±3.1	12 28.1 ±3.8	12 26.9 ±3.1	12 27.5 ±3.1	6 26.0 ±3.2	6 25.8 ±3.4	6 26.0 ±3.1	6 25.4 ±3.9
Female	Control	N Mean S.D.	12 15.8 ±1.3	12 18.1 ±1.9	12 16.9 ±1.7	12 17.2 ±2.3	12 17.9 ±2.1	12 19.1 ±3.0	12 18.5 ±1.9	12 19.1 ±2.5	6 16.4 ±2.5	6 20.1 ±3.4	6 18.4 ±1.5	6 18.0 ±3.5
	100mg/kg	N Mean S.D.	6 16.5 ±1.5	6 17.0 ±1.8	6 17.5 ±2.1	6 17.5 ±2.0	6 19.4 ±1.8	6 19.0 ±1.9	6 17.5 ±1.8	6 19.2 ±1.5				
	300mg/kg	N Mean S.D.	6 15.2 ±2.4	6 16.9 ±2.8	6 18.1 ±2.2	6 17.7 ±2.6	6 18.8 ±2.4	6 19.1 ±2.1	6 16.6 ±3.1	6 19.8 ±3.6				
	1000mg/kg	N Mean S.D.	12 15.6 ±1.8	12 16.6 ±2.1	12 18.1 ±2.2	12 17.9 ±1.6	12 19.1 ±2.6	12 20.2 ±2.1	12 18.4 ±2.9	12 20.7 ±2.5	6 18.7 ±3.3	6 20.5 ±2.6	6 18.2 ±1.9	6 19.1 ±2.6

*: P<0.05 (significantly different from control).

Table 4 Urinary findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Urine volume (ml/24hr)	Osmotic pressure (Osm/kg)	Specific gravity
Male	Control	12	12.0 ±4.0	1.494 ±0.394	1.045 ±0.014
	100mg/kg	6	18.0 ±4.8	1.016** ±0.184	1.037 ±0.010
	300mg/kg	6	18.8* ±5.9	1.008** ±0.265	1.031* ±0.008
	1000mg/kg	12	15.0 ±5.3	1.233 ±0.225	1.040 ±0.008
Female	Control	12	8.1 ±5.1	1.488 ±0.623	1.047 ±0.021
	100mg/kg	6	8.0 ±3.4	1.785 ±0.366	1.059 ±0.014
	300mg/kg	6	10.4 ±3.6	1.127 ±0.150	1.035 ±0.005
	1000mg/kg	12	9.0 ±6.7	1.623 ±0.771	1.053 ±0.027

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D.

Table 4 - continued Urinary findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Color			pH						Protein				Glucose		Ketone body		Bilirubin	
			PY	Y	YB	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	±	+	*	-	-	-	-	-
Male	Control	12	1	11	0	0	0	0	0	9	3	0	0	9	3	0	12	12	12	12	
	100mg/kg	6	2	4	0	0	0	0	0	3	3	0	1	5	0	0	6	6	6	6	6
	300mg/kg	6	3	3	0	0	0	0	2	1	3	0	3	2	1	0	6	6	6	6	6
	1000mg/kg	12	4	8	0	0	0	1	1	7	3	0	6	5	0	1	12	12	12	12	12
Female	Control	12	2	9	1	1	1	1	3	2	4	0	10	1	1	0	12	12	12	12	12
	100mg/kg	6	0	6	0	0	0	1	0	3	2	0	5	1	0	0	6	6	6	6	6
	300mg/kg	6	3	3	0	0	0	1	0	3	2	0	4	2	0	0	6	6	6	6	6
	1000mg/kg	12	3	7	2	0	2	0	3	4	2	1	7	3	1	1	12	12	12	12	12

Abbreviation: PY, pale yellow; Y, yellow; YB, yellowish brown.

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; *, moderate; **, severe; ***, very severe.

Table 4 - continued Urinary findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Occult blood				Urobilinogen (mg/dl)
			-	+	*	**	
			<1				
Male	Control	12	12	0	0	0	12
	100mg/kg	6	5	0	0	1	6
	300mg/kg	6	5	1	0	0	6
	1000mg/kg	12	9	3	0	0	12
Female	Control	12	11	1	0	0	12
	100mg/kg	6	6	0	0	0	6
	300mg/kg	6	6	0	0	0	6
	1000mg/kg	12	10	1	1	0	12

Grade sign: -, none; ‡, trace; +, slight; *, moderate; **, severe; ***, very severe.

Table 4 - continued Urinary findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Urinary sediment										
			Epithelial cells		Erythrocytes		Leucocytes		Casts		Crystals		
			-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	*
Male	Control	12	11	1	12	0	12		12		9	2	1
	100mg/kg	6	6	0	6	0	6		6		6	0	0
	300mg/kg	6	6	0	6	0	6		6		5	1	0
	1000mg/kg	12	12	0	11	1	12		12		10	2	0
Female	Control	12	12	0	12	0	12		12		12	0	0
	100mg/kg	6	6	0	6	0	6		6		6	0	0
	300mg/kg	6	6	0	6	0	6		6		6	0	0
	1000mg/kg	12	12	0	12	0	12		12		11	1	0

Grade signs are as follows.

Epithelial cells: -, < 3/field; +, 3/field and < 10/field; *, 10/field and < 20/field; **, ≥20/field.

Erythrocytes: -, < 10/field; +, 10/field and < 30/field; *, 30/field and < 100/field; **, countless.

Leucocytes: -, < 3/field; +, 3/field and < 20/field; *, 20/field and < 40/field; **, ≥40/field.

Casts: -, none; +, ≥1/all field.

Crystals: -, < 10/field; +, 10/field and < 20/field; *, 20/field and < 30/field; **, countless.

Table 5 Urinary findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Urine volume (ml/24hr)	Osmotic pressure (Osm/kg)	Specific gravity
Male	Control	6	13.5 ±4.7	1.415 ±0.408	1.044 ±0.013
	1000mg/kg	6	16.0 ±6.7	1.350 ±0.475	1.043 ±0.016
Female	Control	6	11.7 ±5.1	1.355 ±0.350	1.041 ±0.011
	1000mg/kg	6	14.2 ±5.7	1.282 ±0.591	1.038 ±0.017

Not significantly different from control.
 Values are mean±S.D.

Table 5 - continued

Urinary findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Color		pH				Protein			Glucose		Ketone body		Bilirubin	
			PY	Y	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	-	-	-	-	-	-
Male	Control	6	0	6	0	3	3	0	1	2	3	6	6	6	6	6	
	1000mg/kg	6	1	5	0	0	5	1	3	2	1	6	6	6	6	6	
Female	Control	6	1	5	1	2	1	2	6	0	0	6	6	6	6	6	
	1000mg/kg	6	1	5	0	2	2	2	6	0	0	6	6	6	6	6	

Abbreviation: PY, pale yellow; Y, yellow.

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; *, moderate; **, severe; ***, very severe.

Table 5 - continued Urinary findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Occult blood				Urobilinogen (mg/dl)
			-	+	*	**	
Male	Control	6	4	0	0	2	6
	1000mg/kg	6	6	0	0	0	6
Female	Control	6	3	1	1	1	6
	1000mg/kg	6	6	0	0	0	6

Grade sign: -, none; +, trace; +, slight; *, moderate; **, severe; **, very severe.

Table 5 - continued

Urinary findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Urinary sediment										
			Epithelial cells		Erythrocytes		Leucocytes		Casts		Crystals		
			-	+	-	+	-		-		-	+	*
Male	Control	6	4	2	5	1	6		6		5	1	0
	1000mg/kg	6	5	1	6	0	6		6		5	0	1
Female	Control	6	6	0	5	1	6		6		6	0	0
	1000mg/kg	6	6	0	6	0	6		6		6	0	0

Grade signs are as follows.

Epithelial cells: -, < 3/field; +, 3/field \leq and < 10/field; *, 10/field \leq and < 20/field; **, \geq 20/field.Erythrocytes: -, < 10/field; +, 10/field \leq and < 30/field; *, 30/field \leq and < 100/field; **, countless.Leucocytes: -, < 3/field; +, 3/field \leq and < 20/field; *, 20/field \leq and < 40/field; **, \geq 40/field.Casts: -, none; +, \geq 1/all field.Crystals: -, < 10/field; +, 10/field \leq and < 20/field; *, 20/field \leq and < 30/field; **, countless.

Table 6 Hematological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Leucocyte ($10^3/\mu\text{l}$)	Erythrocyte ($10^4/\mu\text{l}$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	MCV (fl)	MCH (pg)
Male	Control	6	93 ±21	792 ±30	15.1 ±0.4	46.6 ±1.6	101.2 ±8.8	59 ±1	19.1 ±0.5
	100mg/kg	6	71 ±14	743 ±28	14.6 ±0.3	45.6 ±1.0	92.7 ±8.5	62** ±1	19.6 ±0.4
	300mg/kg	6	86 ±36	757 ±45	14.9 ±0.6	46.6 ±2.0	108.6 ±8.3	62** ±1	19.7 ±0.5
	1000mg/kg	6	87 ±29	766 ±29	14.9 ±0.5	46.9 ±1.3	99.4 ±4.7	61** ±2	19.5 ±0.6
Female	Control	6	60 ±15	751 ±29	14.8 ±0.4	45.4 ±1.2	101.7 ±8.5	61 ±1	19.7 ±0.4
	100mg/kg	6	70 ±19	752 ±32	14.6 ±0.6	45.4 ±2.5	102.4 ±5.4	60 ±2	19.4 ±0.5
	300mg/kg	6	64 ±10	781 ±32	15.2 ±0.5	46.4 ±1.1	103.9 ±10.2	60 ±2	19.5 ±0.7
	1000mg/kg	6	57 ±9	738 ±31	14.7 ±0.6	44.9 ±1.9	100.9 ±8.0	61 ±2	20.0 ±1.0

**: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D.

Table 6 - continued Hematological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	MCHC (%)	Prothrombin time (sec)	APTT (sec)
Male	Control	6	32.4 ±0.5	13.3 ±2.9	25.2 ±1.7
	100mg/kg	6	32.0 ±0.3	13.4 ±1.7	24.3 ±2.0
	300mg/kg	6	32.0 ±0.2	12.4 ±1.3	23.2 ±3.2
	1000mg/kg	6	31.8* ±0.4	12.3 ±1.2	23.3 ±0.9
Female	Control	6	32.5 ±0.5	10.5 ±0.2	18.7 ±1.1
	100mg/kg	6	32.1 ±0.8	10.5 ±0.3	19.7 ±1.7
	300mg/kg	6	32.7 ±0.3	10.6 ±0.4	18.5 ±0.9
	1000mg/kg	6	32.8 ±0.6	10.5 ±0.4	20.1 ±1.0

*: P<0.05 (significantly different from control).
 Values are mean±S.D.

Table 6 - continued Hematological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Differential leucocyte count					
			Eosinophil (%)	Neutro-Stab. (%)	Neutro-Seg. (%)	Lymphocyte (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)
Male	Control	6	0.5 ±0.5	0.0 ±0.0	13.0 ±2.6	85.8 ±2.7	0.0 ±0.0	0.7 ±0.5
	100mg/kg	6	0.5 ±0.8	0.0 ±0.0	13.3 ±5.6	85.7 ±5.4	0.0 ±0.0	0.5 ±0.5
	300mg/kg	6	0.5 ±0.5	0.0 ±0.0	14.2 ±6.2	84.8 ±6.5	0.0 ±0.0	0.5 ±0.5
	1000mg/kg	6	1.0 ±1.3	0.0 ±0.0	11.5 ±4.4	86.7 ±3.9	0.0 ±0.0	0.8 ±1.2
Female	Control	6	0.7 ±1.0	0.0 ±0.0	14.3 ±3.3	84.3 ±3.3	0.0 ±0.0	0.7 ±0.8
	100mg/kg	6	1.0 ±1.3	0.0 ±0.0	10.5 ±3.5	88.3 ±4.5	0.0 ±0.0	0.2 ±0.4
	300mg/kg	6	1.0 ±0.9	0.0 ±0.0	9.5 ±3.8	88.7 ±4.3	0.0 ±0.0	0.8 ±1.0
	1000mg/kg	6	1.5 ±2.3	0.0 ±0.0	10.5 ±5.3	87.2 ±7.7	0.0 ±0.0	0.8 ±0.8

Not significantly different from control.
 Values are mean±S.D.

Table 7 Hematological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Leucocyte ($10^2/\mu\text{l}$)	Erythrocyte ($10^4/\mu\text{l}$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	MCV (fl)	MCH (pg)
Male	Control	6	94 ±30	862 ±31	15.1 ±0.6	47.9 ±1.6	100.9 ±10.2	56 ±1	17.6 ±0.4
	1000mg/kg	6	103 ±30	844 ±42	15.0 ±0.6	47.3 ±1.8	98.3 ±10.2	56 ±1	17.8 ±0.6
Female	Control	6	64 ±14	795 ±28	14.7 ±0.4	45.9 ±1.7	103.3 ±7.7	58 ±1	18.5 ±0.4
	1000mg/kg	6	46 ±14	780 ±32	14.3 ±0.2	44.8 ±1.4	107.1 ±14.7	58 ±1	18.4 ±0.5

Not significantly different from control.
Values are mean±S.D.

Table 7 - continued Hematological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	MCHC (%)	Prothrombin time (sec)	APTT (sec)
Male	Control	6	31.6 ±0.2	13.3 ±0.9	24.2 ±1.8
	1000mg/kg	6	31.7 ±0.6	13.1 ±1.6	22.4 ±2.6
Female	Control	6	32.1 ±0.5	10.3 ±0.6	17.7 ±1.2
	1000mg/kg	6	32.0 ±0.6	10.2 ±0.7	16.2 ±2.7

Not significantly different from control.

Values are mean±S.D.

Table 7 - continued Hematological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Differential leucocyte count					
			Eosinophil (%)	Neutro-Stab. (%)	Neutro-Seg. (%)	Lymphocyte (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)
Male	Control	6	0.2 ±0.4	0.0 ±0.0	6.3 ±2.3	92.5 ±2.6	0.0 ±0.0	1.0 ±1.1
	1000mg/kg	6	0.2 ±0.4	0.0 ±0.0	8.7 ±5.0	90.2 ±5.2	0.0 ±0.0	1.0 ±0.9
Female	Control	6	0.7 ±0.8	0.0 ±0.0	13.8 ±5.4	85.0 ±6.3	0.0 ±0.0	0.5 ±0.8
	1000mg/kg	6	1.3 ±1.5	0.0 ±0.0	17.3 ±10.7	80.2 ±10.8	0.0 ±0.0	1.2 ±0.4

Not significantly different from control.

Values are mean±S.D.

Table 8 Biochemical findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	T.protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G ratio	T.bilirubin (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	γ -GTP (IU/l)	ALP (IU/l)
Male	Control	6	5.0 ±0.1	3.6 ±0.1	2.60 ±0.41	0.0 ±0.0	88 ±13	19 ±3	0.3 ±0.2	281 ±42
	100mg/kg	6	4.9 ±0.2	3.5 ±0.1	2.48 ±0.26	0.0 ±0.0	82 ±10	18 ±3	0.2 ±0.2	302 ±53
	300mg/kg	6	5.1 ±0.3	3.6 ±0.2	2.39 ±0.15	0.0 ±0.0	95 ±17	17 ±3	0.4 ±0.3	246 ±76
	1000mg/kg	6	5.1 ±0.2	3.6 ±0.1	2.42 ±0.16	0.0 ±0.0	86 ±14	17 ±2	0.2 ±0.2	256 ±67
Female	Control	6	5.2 ±0.3	4.0 ±0.3	3.14 ±0.42	0.0 ±0.1	87 ±20	15 ±3	0.3 ±0.3	172 ±26
	100mg/kg	6	5.2 ±0.4	3.8 ±0.2	2.74 ±0.13	0.0 ±0.0	81 ±19	15 ±3	0.2 ±0.2	162 ±24
	300mg/kg	6	5.5 ±0.3	4.0 ±0.2	2.86 ±0.17	0.0 ±0.0	78 ±10	14 ±2	0.2 ±0.2	188 ±63
	1000mg/kg	6	5.3 ±0.2	3.9 ±0.2	2.77 ±0.17	0.0 ±0.0	88 ±11	15 ±2	0.2 ±0.2	133 ±41

Not significantly different from control.

Values are mean±S.D.

Table 8 - continued Biochemical findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Cholinesterase (IU/l)	Acetyl cholinesterase (µPH)	T.cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	Phospholipids (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
Male	Control	6	50 ±6	0.00 ±0.00	58 ±13	47 ±16	97 ±16	107 ±14	16.7 ±2.2	0.4 ±0.0
	100mg/kg	6	51 ±13	0.00 ±0.01	55 ±8	60 ±17	98 ±9	107 ±10	16.1 ±1.6	0.4 ±0.1
	300mg/kg	6	52 ±14	0.00 ±0.01	57 ±8	55 ±24	100 ±11	118 ±21	16.3 ±2.7	0.4 ±0.1
	1000mg/kg	6	58 ±10	0.01 ±0.01	57 ±6	65 ±28	101 ±12	108 ±6	17.3 ±2.1	0.4 ±0.0
Female	Control	6	489 ±80	0.39 ±0.07	67 ±5	24 ±8	132 ±13	92 ±14	24.9 ±2.9	0.5 ±0.1
	100mg/kg	6	382 ±119	0.28 ±0.10	54 ±12	20 ±5	105* ±18	92 ±15	25.1 ±2.0	0.5 ±0.1
	300mg/kg	6	433 ±94	0.32 ±0.09	60 ±12	27 ±8	121 ±23	95 ±13	23.8 ±3.9	0.5 ±0.1
	1000mg/kg	6	515 ±127	0.41 ±0.12	56 ±7	22 ±3	110 ±12	90 ±11	24.6 ±6.3	0.5 ±0.1

*: P<0.05 (significantly different from control).

Values are mean±S.D.

Table 8 - continued Biochemical findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	IP (mg/dl)	Ca (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
Male	Control	6	7.7 ±0.5	9.5 ±0.1	147.8 ±0.7	4.22 ±0.18	107.8 ±0.8
	100mg/kg	6	7.4 ±0.6	9.3* ±0.1	146.4** ±0.4	4.24 ±0.17	107.5 ±1.1
	300mg/kg	6	7.4 ±0.2	9.5 ±0.3	146.5** ±0.6	4.36 ±0.14	106.3 ±2.1
	1000mg/kg	6	7.7 ±0.4	9.5 ±0.3	146.1** ±0.6	4.32 ±0.12	106.2 ±1.3
Female	Control	6	8.6 ±0.6	9.7 ±0.2	146.5 ±0.7	4.44 ±0.36	109.1 ±1.1
	100mg/kg	6	8.2 ±1.1	9.6 ±0.4	146.6 ±0.7	4.44 ±0.23	109.8 ±1.1
	300mg/kg	6	7.7 ±0.7	9.8 ±0.3	146.2 ±0.8	4.48 ±0.29	108.4 ±1.0
	1000mg/kg	6	7.8 ±0.7	9.8 ±0.3	145.8 ±0.7	4.29 ±0.16	108.8 ±1.3

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).
Values are mean±S.D.

Table 9 Biochemical findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	T.protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G ratio	T.bilirubin (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	γ -GTP (IU/l)	ALP (IU/l)
Male	Control	6	5.1 ±0.1	3.5 ±0.2	2.24 ±0.23	0.1 ±0.1	99 ±24	19 ±2	0.4 ±0.2	235 ±37
	1000mg/kg	6	5.1 ±0.1	3.5 ±0.1	2.20 ±0.10	0.0 ±0.1	100 ±18	21 ±3	0.3 ±0.2	227 ±53
Female	Control	6	5.4 ±0.4	3.9 ±0.3	2.48 ±0.10	0.1 ±0.0	109 ±20	19 ±2	0.3 ±0.2	144 ±48
	1000mg/kg	6	5.5 ±0.2	4.0 ±0.1	2.73** ±0.16	0.1 ±0.0	103 ±13	17 ±4	0.3 ±0.3	152 ±18

**: P<0.01 (significantly different from control).

Values are mean±S.D.

Table 9 - continued Biochemical findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Cholinesterase (IU/l)	Acetyl cholinesterase (µPH)	T.cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	Phospholipids (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
Male	Control	6	53 ±16	0.02 ±0.01	54 ±11	76 ±31	103 ±15	116 ±12	16.4 ±2.2	0.5 ±0.0
	1000mg/kg	6	54 ±13	0.02 ±0.02	54 ±7	67 ±18	100 ±6	116 ±9	17.0 ±1.0	0.5 ±0.1
Female	Control	6	510 ±239	0.45 ±0.23	62 ±14	19 ±4	120 ±27	93 ±10	22.2 ±2.7	0.6 ±0.1
	1000mg/kg	6	485 ±73	0.42 ±0.07	71 ±15	29* ±11	139 ±18	99 ±9	21.3 ±1.2	0.5 ±0.0

*: P<0.05 (significantly different from control).

Values are mean±S.D.

Table 9 - continued

Biochemical findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	IP (mg/dl)	Ca (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
Male	Control	6	6.9 ±0.5	9.5 ±0.2	146.0 ±1.2	4.25 ±0.21	106.3 ±1.4
	1000mg/kg	6	6.9 ±0.4	9.6 ±0.2	144.9 ±0.6	4.32 ±0.18	105.5 ±1.1
Female	Control	6	6.1 ±0.6	9.8 ±0.3	145.2 ±0.5	4.20 ±0.24	108.9 ±1.5
	1000mg/kg	6	5.7 ±0.6	9.6 ±0.2	145.7 ±0.7	4.25 ±0.24	109.0 ±1.2

Not significantly different from control.

Values are mean±S.D.

Table 10 Necropsy findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

	Sex Group and dose	Male				Female			
		Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg	Control	100mg/kg	300mg/kg	1000mg/kg
Organ and findings	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Respiratory system									
Lung									
Dark red spot		0	0	0	1	0	0	0	0
Nervous system									
Eye ball									
Dark red spots, bilateral		0	0	0	0	1	0	0	0
Integumentary system									
Integument									
Trauma, cervical skin		0	1	0	0	0	0	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 11 Necropsy findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

	Sex	Male		Female	
		Control	1000mg/kg	Control	1000mg/kg
Organs and findings	Number of animals	6	6	6	6
All organs and tissues		NR	NR	NR	NR

NR: no remarkable change.

Table 12 Organ weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Final Body Weight		Brain		Heart		Lungs	
			(g)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)
Male	Control	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	339.9	2.12	0.63	1.21	0.35	1.19	0.35
		S.D.	±25.1	±0.06	±0.04	±0.17	±0.03	±0.07	±0.01
	100mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	344.4	2.09	0.61	1.19	0.35	1.19	0.35
		S.D.	±27.4	±0.06	±0.05	±0.12	±0.02	±0.09	±0.01
	300mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	360.1	2.07	0.58	1.30	0.36	1.22	0.34
		S.D.	±37.4	±0.06	±0.05	±0.12	±0.04	±0.08	±0.02
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	365.9	2.13	0.58	1.24	0.34	1.27	0.35
		S.D.	±26.8	±0.02	±0.04	±0.12	±0.03	±0.12	±0.02
Female	Control	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	206.9	1.94	0.94	0.80	0.38	0.96	0.46
		S.D.	±12.2	±0.06	±0.04	±0.06	±0.03	±0.06	±0.04
	100mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	222.6	1.96	0.89	0.79	0.35	0.95	0.43
		S.D.	±19.2	±0.03	±0.07	±0.06	±0.03	±0.07	±0.02
	300mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	213.8	1.94	0.91	0.79	0.37	0.97	0.46
		S.D.	±14.8	±0.09	±0.07	±0.05	±0.03	±0.04	±0.05
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	218.6	2.02	0.92	0.82	0.37	1.01	0.46
		S.D.	±10.9	±0.10	±0.06	±0.06	±0.02	±0.06	±0.02

Not significantly different from control.

Table 12 - continued Organ weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Thymus			Liver			Spleen		Kidneys	
		(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)
Male	Control	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.54	0.16	10.42	3.06	0.67	0.20	2.40	0.71	0.71
		S.D.	±0.07	±0.02	±1.12	±0.16	±0.05	±0.02	±0.19	±0.03	
	100mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.53	0.16	10.78	3.12	0.69	0.20	2.44	0.71	0.71
		S.D.	±0.07	±0.03	±1.50	±0.22	±0.11	±0.02	±0.12	±0.04	
	300mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.70*	0.20*	11.42	3.15	0.74	0.21	2.55	0.71	0.71
		S.D.	±0.09	±0.01	±2.22	±0.30	±0.13	±0.03	±0.28	±0.05	
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.58	0.16	11.73	3.19	0.77	0.21	2.54	0.69	0.69
		S.D.	±0.14	±0.03	±1.89	±0.36	±0.12	±0.03	±0.20	±0.03	
Female	Control	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.39	0.19	6.26	3.03	0.47	0.23	1.62	0.78	0.78
		S.D.	±0.04	±0.02	±0.50	±0.21	±0.02	±0.02	±0.08	±0.04	
	100mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.48	0.22	6.62	2.98	0.49	0.22	1.62	0.73	0.73
		S.D.	±0.09	±0.04	±0.68	±0.25	±0.08	±0.02	±0.10	±0.06	
	300mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.46	0.22	6.75	3.16	0.51	0.24	1.72	0.81	0.81
		S.D.	±0.12	±0.07	±0.47	±0.22	±0.08	±0.04	±0.07	±0.07	
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.39	0.18	6.70	3.06	0.50	0.23	1.69	0.77	0.77
		S.D.	±0.08	±0.03	±0.71	±0.23	±0.06	±0.04	±0.08	±0.05	

*: P<0.05 (significantly different from control).

Table 12 - continued Organ weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Sex	Group and dose	Adrenals			Testes		Ovaries	
		(mg)	(mg/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(mg)	(mg/100gB.W.)	
Male	Control	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	50.9	15.0	2.99	0.88		
		S.D.	±9.2	±2.4	±0.13	±0.06		
	100mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	50.0	14.5	2.85	0.83		
		S.D.	±7.1	±1.4	±0.10	±0.07		
	300mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	49.6	13.8	3.03	0.84		
		S.D.	±5.7	±0.8	±0.23	±0.07		
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	58.8	16.0	3.05	0.84		
		S.D.	±7.0	±1.2	±0.18	±0.10		
Female	Control	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	64.5	31.3		76.1	36.9	
		S.D.	±6.3	±3.8		±7.6	±3.9	
	100mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	65.4	29.7		86.9	39.3	
		S.D.	±8.8	±6.2		±5.5	±3.6	
	300mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	60.1	28.0		86.0	40.2	
		S.D.	±12.7	±4.8		±8.5	±2.1	
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	64.4	29.4		90.2	41.3	
		S.D.	±8.2	±3.1		±16.6	±7.8	

Not significantly different from control.

Table 13 Organ weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Final Body Weight (g)	Brain		Heart		Lungs	
			(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)
Male	Control	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	380.2	2.12	0.56	1.26	0.33	0.33
		S.D.	±42.6	±0.11	±0.05	±0.25	±0.03	±0.03
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	382.4	2.17	0.56	1.30	0.33	0.33
		S.D.	±40.7	±0.12	±0.06	±0.25	±0.04	±0.02
Female	Control	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	233.1	2.02	0.87	0.88	0.38	0.44
		S.D.	±14.7	±0.03	±0.05	±0.09	±0.02	±0.03
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	231.7	2.02	0.88	0.84	0.36	0.42
		S.D.	±15.7	±0.05	±0.06	±0.06	±0.02	±0.02

Not significantly different from control.

Table 13 - continued Organ weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Thymus		Liver		Spleen		Kidneys	
		(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)
Male	Control	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.44	0.12	11.05	2.90	0.72	0.19	2.66
		S.D.	±0.11	±0.03	±1.60	±0.22	±0.10	±0.02	±0.32
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.47	0.12	11.10	2.82	0.73	0.19	2.63
		S.D.	±0.05	±0.02	±1.42	±0.10	±0.08	±0.01	±0.34
Female	Control	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.34	0.14	6.62	2.84	0.55	0.24	1.62
		S.D.	±0.08	±0.03	±0.69	±0.19	±0.03	±0.02	±0.14
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.38	0.17	6.74	2.90	0.52	0.23	1.63
		S.D.	±0.06	±0.03	±0.77	±0.17	±0.08	±0.02	±0.08

Not significantly different from control.

Table 13 - continued Organ weights in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Adrenals			Testes		Ovaries	
		(mg)	(mg/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(mg)	(mg/100gB.W.)	
Male	Control	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	52.2	13.9	2.95	0.78		
		S.D.	±9.9	±3.0	±0.27	±0.07		
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
		Mean	54.0	13.9	3.14	0.81		
		S.D.	±9.7	±2.5	±0.30	±0.09		
Female	Control	N	6	6		6	6	6
		Mean	70.9	30.4		86.2	37.0	
		S.D.	±4.3	±1.2		±10.9	±4.0	
	1000mg/kg	N	6	6		6	6	6
		Mean	64.0	27.6*		81.2	35.0	
		S.D.	±8.9	±2.3		±9.5	±3.2	

*: P<0.05 (significantly different from control).

Table 14A Histopathological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Organs and findings	Sex Group and dose	Male						Female					
		Control		100mg/kg		1000mg/kg		Control		1000mg/kg			
		-	+	*	*	-	+	*	*	-	+	*	*
Number of animals		6		1		6		6		6		6	
Respiratory system													
Lung		(0)		(0)		(1)		(0)		(0)			
Hemorrhage, localized						0	1	0	0				
Cellular infiltration, localized						0	1	0	0				
Nervous system													
Eye ball		(0)		(0)		(0)		(1)		(0)			
Hemorrhage, vitreous body, bilateral						0	1	0	0				
Integumentary system													
Integument		(0)		(1)		(0)		(0)		(0)			
Erosion, cervical skin				0	1	0	0						

Grade sign: -, none; +, mild; *, moderate; **, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, spleen, heart, kidney and adrenal in the control group and 1000mg/kg group.

Table 14B Histopathological findings in rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate for 28 days

Organs and findings	Sex Group and dose	Male			Female	
		Control	100mg/kg	1000mg/kg	Control	1000mg/kg
		6	1	6	6	6
Respiratory system						
Lung		*	*		*	*
Hemorrhage, localized				1		
Cellular infiltration, localized				1		
Nervous system						
Eye ball		*	*	*		*
Hemorrhage, vitreous body, bilateral					1	
Integumentary system						
Integument		*		*	*	*
Erosion, cervical skin			1			

*: not examined.

No remarkable changes were observed in the liver, spleen, heart, kidney and adrenal in control group and 1000mg/kg group.