

最終報告書

表 題：ディスパーズレッド 206 のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験

試験番号：SR-9986

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

頁

要約	3
緒言	4
材料および方法	4
成績	12
考察	15
参考文献	17

Figures	添付
---------------	----

1. Body weight changes of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
2. Body weight changes of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
3. Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
4. Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Tables	添付
--------------	----

1. Experimental design for 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) in rats (SR-9986)
2. General appearance of rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
3. Body weight changes of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
4. Body weight changes of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
5. Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
6. Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
7. Urinary findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

8. Urinary findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
9. Urinary findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
10. Urinary findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
11. Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
12. Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
13. Hematological findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
14. Hematological findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
15. Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
16. Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
17. Biochemical findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
18. Biochemical findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
19. Gross findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
20. Gross findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
21. Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
22. Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
23. Absolute and relative organ weights of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
24. Absolute and relative organ weights of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
25. Histopathological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
26. Histopathological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

要 約

ディスパーズレッド 206 の 0 (対照群)、250、500 および 1000 mg/kg を 1 群につき雌雄各 7 匹の Crj:CD(SD) IGS ラットに 28 日間反復経口投与してその毒性を検討した。また、投与終了の翌日から 0 および 1000 mg/kg 投与群の雌雄各 7 匹について 14 日間観察を継続し、投与期間中にみられた毒性の回復性についても検討し、以下の成績を得た。

1. 一般状態、体重、摂餌量および尿検査では、投与期間および回復期間いずれも雌雄の各投与群ともに被験物質投与による影響は認められなかった。
2. 血液学的検査では、雄の 500 mg/kg 投与群および雌雄の 1000 mg/kg 投与群に、ヘマトクリット値あるいは平均赤血球ヘモグロビン量の低値が認められた。

回復期間終了時にも雌雄の 1000 mg/kg 投与群に平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量の低値、雌にヘモグロビン量の低値が認められた。

3. 血液化学的検査では、250 mg/kg 以上の投与群の雄に γ -グロブリン分画比の低値が認められた。

回復期間終了時には、1000 mg/kg 投与群の雌に無機リン濃度の高値が認められた。

4. 剖検では、被験物質の色調を反映して、雌雄の 250 mg/kg 以上の投与群に消化管(空腸・回腸・盲腸)の内容物や器官および組織(空腸・回腸・腹腔内脂肪組織・全身の皮下組織)の赤色あるいは暗緑色の変色が認められた。

回復期間終了時にも全身の皮下組織および腹腔内脂肪組織には同様の変化が認められた。

5. 器官重量では 250 mg/kg 以上の投与群の雄および 1000 mg/kg 投与群の雌で肝臓重量の高値が認められた。また、500 mg/kg 以上の投与群で雌雄の胸腺重量の低値、1000 mg/kg 投与群で雌の卵巢重量の低値が認められた。

回復期間終了時には 1000 mg/kg 投与群の雄で肝臓重量の高値および脾臓重量の低値、雌で下垂体重量の低値が認められた。

6. 病理組織学的検査では、投与期間および回復期間いずれも 1000 mg/kg 投与群の雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のことより、雄では 250 mg/kg 以上の投与群で肝臓重量の高値ならびに γ -グロブリン分画比の低値、雌では 500 mg/kg 以上の投与群で胸腺重量の低値など被験物質投与による影響が認められていることから、本試験条件下におけるディスパーズレッド 206 の無影響量(NOEL)は、雄で 250 mg/kg/day 未満、雌で 250 mg/kg/day と考えられた。

緒 言

本試験は、OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環として、ディスパーズレッド 206 の 0 (対照群)、250、500 および 1000 mg/kg を 1 群につき雌雄各 7 匹の Crj:CD(SD) IGS ラットに 28 日間反復経口投与してその毒性を検討した。また、投与終了の翌日から 0 および 1000 mg/kg 投与群の雌雄各 7 匹について 14 日間観察を継続し、投与期間中にみられた毒性の回復性についても検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質であるディスパーズレッド 206 (CAS No. : 26630-87-5 および 129710-76-5) は分子式 $C_{28}H_{26}ClN_5O_5S$ 、分子量 579.5、融点 $150^{\circ}C$ 以上、比重約 0.5、分配係数 $\log Pow$ 3.91 の水に懸濁するが不溶で DMSO およびアセトンに可溶の赤黒褐色で無臭の粉末である (Appendix 1-1 および 1-2)。提供者より受入れたディスパーズレッド 206 (ロット番号:) には不純物として水 60.9 wt% が含まれていたことから、乾燥させて粉末としたものを被験物質として使用した。乾燥後の被験物質の水分含量は 0.28% であることが提供者により確認されている (Appendix 2-1)。被験物質は気密容器に入れ、冷所 (実測範囲 $4\sim 9^{\circ}C$) に保存した。被験物質サンプルとして、上記ロットについて約 1 g を採取し、試験施設の検体保存室に保存した。試験期間中の被験物質の安定性については、残余被験物質を用いて提供者が純度の分析を行い確認した (Appendix 2-2)。

2. 対照物質

対照物質には、0.5% メチルセルロース水溶液を使用した。0.5% メチルセルロース水溶液は、メチルセルロース 400 cP (ロット番号: ACN3463、和光純薬工業株式会社) を精秤し、日本薬局方精製水 (ロット番号: 05A1、ヤクハン製薬株式会社) に溶解し、被験物質の溶媒および対照群の投与液として使用した。調製後は遮光気密容器に入れ、冷暗所 (実測範囲 $4\sim 7^{\circ}C$) に調製後 1 週間を限度として保存し、室温に戻してから投与に使用した。

3. 投与液の調製および化学分析

(1) 投与液の調製

投与量ごとに被験物質を乳鉢で研磨後、精秤し、所定の濃度となるように 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁した。調製を投与期間中 4~6 日に 1 回、計 6 回行い、調製液は調製後速やかに遮光気密容器に入れ、使用時まで冷暗所 (実測範囲 $2.3\sim 7.9^{\circ}C$) に保存した。室温

に戻してから投与に使用し、残余調製液は焼却処分とした。

(2) 投与液の化学分析

投与に先立って 50 および 200 mg/mL の調製液について安定性の分析を行った結果、室温で 24 時間、冷暗所保存で 7 日間の安定性が確認された (Appendix 3-1)。また、50 および 200 mg/mL の調製液について均一性が確認された (Appendix 3-2-1 および 3-2-2)。

以下の手順に従って、本試験に用いた初回および最終調製時の各濃度の調製液について、被験物質の濃度の確認を行った。

ディスパーズレッド 206 を N,N-ジメチルホルムアルデヒドに溶解後、0.5%メチルセルロース水溶液を添加し、さらに N,N-ジメチルホルムアルデヒドを加え 1.00 mg/mL の標準溶液を調製した。

各濃度の被験物質調製液に N,N-ジメチルホルムアルデヒドを加え、最終濃度が 1.00 mg/mL となるように試料溶液を調製した。

HPLC システム (日立製作所) の測定条件は以下のように設定した。

カラム	: 特殊仕様 (HITACHI GEL #3053)、4 mm × 150 mm
移動相	: アセトニトリル : 蒸留水 : リン酸 (60 : 40 : 0.5)
測定波長	: 528 nm
流量	: 1.5 mL/min
カラム温度	: 30 °C
Autosampler 温度	: 約 7°C
感度	: 0.4 V
注入量	: 10 µL
分析時間	: 22 分

Autosampler 洗浄液 : アセトニトリル : 蒸留水 (60 : 40)

標準溶液および試料溶液を HPLC に注入し、ディスパーズレッド 206 のピーク面積を測定した。標準溶液のピーク面積と濃度から、調製液濃度および含有率を以下の式により算出した。

$$[\text{調製液濃度 (mg/mL)}] = [\text{標準溶液の濃度 (mg/mL)}] \times [\text{試料溶液のピーク面積/標準溶液のピーク面積平均値}] \times \text{希釈係数}$$

$$[\text{含有率 (\%)}] = [\text{被験物質調製液濃度}] \div [\text{被験物質調製液の表示濃度}] \times 100$$

濃度確認の結果、含有率は 50、100 および 200 mg/mL のそれぞれについて、初回調製時に 94.3、100.0 および 99.3%、最終調製時に 97.5、103.0 および 97.5% であり、いずれも規定範囲内 (90~110%) であることが確認された (Appendix 3-3-1 および 3-3-2)。

以上の分析は株式会社 化合物安全性研究所において行った。

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター生産の SD 系ラット (SPF、Crj:CD(SD)IGS) を用いた。ラットはこの種の試験で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

雌雄各 48 匹を 2000 年 8 月 2 日に 4 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 76～88 g、雌で 73～81 g であった。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について 6 あるいは 7 日間一般状態を 1 日 1 回観察した。さらに、期間中に体重測定を 2 回行った。検疫および馴化期間中、動物に異常はみられなかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間終了後、健康な動物を雌雄各 42 匹を選抜して、5 週齢で試験に供した。検疫および馴化期間終了日 (投与前々日) の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行った。これらの動物の体重範囲は、雄で 120～134 g、雌で 117～132 g であり、平均体重 (雄 127.0 g、雌 122.5 g) の $\pm 20\%$ 以内であった。選抜から外れた動物は試験から除外した。

(4) 動物およびケージの識別

動物は、群分け前は油性フェルトペンで尾部に印を付け、群分け後は耳介に動物番号を入墨し、個体識別を行った。飼育ケージは、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに試験番号および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。群分け後は、性別毎に色分けしたラベルに試験番号、試験群および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物を温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測範囲 21～24 $^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55 \pm 10\%$ (実測範囲 45～68%)、換気回数 10～15 回/時間、照明時間 12 時間 (午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の人工照明) の動物飼育室 (304 号室) で飼育した。動物飼育室の温度および湿度を毎日監視した。

2) 飼育器材および飼育方法

雌雄別にブラケット式金属製金網床ケージ (260W×380D×180H, mm) に、検疫および馴化期間中は 3 匹、群分け後は 1 匹収容した。ケージおよび給餌器は群分け時に 1 回、その後は 2 週に 1 回交換した。受皿は週 2 回洗浄滅菌済みのものと交換した。自動給水装置の水抜きは週 1 回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、1 日 1 回の頻度で実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を 1 週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製 γ 線照射固型飼料、CRF-1 を金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロット(000405、000509)の飼料について分析した。汚染物質の分析は財団法人日本食品分析センターにおいて、微生物検査は飼料製造業者がそれぞれ行った。分析項目と許容値は(株)化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった(Appendix 4-1-1~4-2-2)。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質を、2000年7月19日および2000年10月18日に試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社において行った。分析項目と許容値は(株)化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった(Appendix 5-1 および 5-2)。

(6) 試験群の構成

試験群の構成と各投与群の動物番号を Table 1 に示す。

雌雄いずれも 0(0.5%メチルセルロース水溶液)、250、500 および 1000 mg/kg/day の 4 群を設定し、14 日間の回復群として 0 および 1000 mg/kg/day 群を設けた。

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

雌雄の SD 系ラットに 0(0.5%メチルセルロース水溶液)、250、500 および 1000 mg/kg を 14 日間投与した予備試験(試験番号 SR-9986P)¹⁾の結果、1000 mg/kg 投与群において、雄で肝臓および腎臓、雌で肝臓に重量増加または増加傾向が認められたが、その他には被験物質投与の影響は認められなかった。このことから、高用量群に 1000 mg/kg を設定し、公比 2 で除して、500 および 250 mg/kg の中用量群および低用量群、ならびに溶媒の 0.5%メチルセルロース水溶液を投与する対照群を加えた計 4 群(雌雄)を設定した。

2) 投与

ディスパーズブレット 206 がヒトに経口的に暴露される可能性を考慮し、試験法ガイドラインに従って、1 日 1 回、28 日間、午前 9 時 30 分から正午の間に胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した。ただし、尿検査日は正午から午後 0 時半の間に投与した。

投与容量は 5 mL/kg とし、各個体の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出した。

(8) 観察、測定および検査項目

1) 一般状態観察

投与開始日を投与 1 日、投与 28 日の翌日を回復 1 日としてそれぞれ起算し、投与終了時解剖例は投与 28 日の翌日の剖検日まで、回復終了時解剖例は回復 14 日の翌日の剖検日まで、個々の動物の生死、外観、行動等について、毎日の投与前および投与後に各 1 回観察した。回復期間中は毎日 1 回観察した。

2) 体重測定

個々の動物の体重を、投与 1、2、7、14、21 および 28 日の投与前、回復 1、7 および 14 日ならびに各期間終了の翌日の剖検日に、電子天秤(ザルトリウス 1401 B MP7-2 および 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社)を用いて測定した。

体重増加量および体重増加率を以下の計算式により算出した。

投与期間：体重増加量＝(投与 28 日体重)－(投与 1 日体重)

体重増加率＝[(体重増加量)／(投与 1 日体重)]×100

回復期間：体重増加量＝(回復 14 日体重)－(回復 1 日体重)

体重増加率＝[(体重増加量)／(回復 1 日体重)]×100

3) 摂餌量測定

投与 1、2、7、14、21 および 28 日の投与前、回復 1、7 および 14 日の摂餌量を個々の動物について測定した。投与開始前日に適当量を測定してケージ毎に給与し、その後は測定日に残量および給与量を測定した。給与量から残量を減じた後、1 日分の消費量を算出して摂餌量とした。測定には電子天秤(ザルトリウス 1401 B MP7-2 および 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社)を使用した。

4) 尿検査

投与 4 週(投与 26～27 日)および回復 2 週(回復 12～13 日)に、全例について非絶食下でラット用代謝ケージ(KN-646、B-1 型、夏目製作所)を用いて採尿し、投与直後から 3 時間前後までに排泄した新鮮尿について①～⑨を、また約 21 時間の蓄尿で⑩および⑪を実施し、同時に⑫を測定した。採取した尿は検査終了後に廃棄した。

検査項目および検査方法：

① pH	試験紙法(マルティステックス、バイエル メディカル)
② 蛋白(Pro)	試験紙法(マルティステックス、バイエル メディカル)
③ 糖(Glu)	試験紙法(マルティステックス、バイエル メディカル)
④ ケトン体(Ket)	試験紙法(マルティステックス、バイエル メディカル)
⑤ ウロビリノーゲン(Uro)	試験紙法(マルティステックス、バイエル メディカル)
⑥ ビリルビン(Bil)	試験紙法(マルティステックス、バイエル メディカル)
⑦ 潜血反応(Occult blood)	試験紙法(マルティステックス、バイエル メディカル)

⑧色調(Color)	肉眼観察
⑨沈渣(Urinary sediments)	鏡検
⑩尿量(U-Vol)	容量測定
⑪比重(Specific gravity)	屈折計法(尿比重屈折計コリコン-S、アタゴ)
⑫採尿中の飲水量(Water consumption)	給水瓶の重量測定による

5) 血液学的検査

全例について、約 16～21 時間絶食後、ラットをエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血した。①～⑩については EDTA・2K(ベノジェクト II 真空採血管、テルモ株式会社)で処理した血液を用い、⑪および⑫については 3.8%クエン酸ナトリウムで処理し、3000 回転/分で 10 分間の遠心分離で得られた血漿を用いた。得られた血液および血漿は検査終了後、廃棄した。

検査項目および検査方法：

①赤血球数(RBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
②ヘマトクリット値(Ht)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
③ヘモグロビン量(Hb)	シアンメトヘモグロビン法 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
④平均赤血球容積(MCV)	RBC, Ht 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑤平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	RBC, Hb 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑥平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	Ht, Hb 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑦網赤血球数(Ret)	Brecher 法(鏡検)
⑧血小板数(Plat)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑨白血球数(WBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑩白血球百分比(Hemogram of WBC)	May-Grünwald-Giemsa 染色(鏡検)
⑪プロトロンビン時間(PT)	トロンボプラスチン法 (血液凝固自動測定装置アメルンゲ KC-10A、バクスター)
⑫活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)	エラジン酸法 (血液凝固自動測定装置アメルンゲ KC-10A、バクスター)

6) 血液化学的検査

全例について、約 16～21 時間絶食後、エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血した。①、④および⑥についてはヘパリンナトリウム(ヘパリンナトリウム注、1000 単位/mL、持田製

薬株式会社)約 20 単位で処理後、3000 回転/分で 10 分間の遠心分離で得られた血漿を用いて検査した。他の項目については分離剤入り試験管(セパクリーン、栄研器材株式会社)に血液を採取し、3000 rpm で 10 分間の遠心分離で得られた血清を用いて検査した。得られた血漿および血清は検査終了後、-20℃以下で凍結保存した。

検査項目および検査方法：

① GOT	IFCC 法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
② GPT	IFCC 法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
③ アルカリホスファターゼ (ALP)	Bessey-Lowry 法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
④ 乳酸脱水素酵素 (LDH)	Wróblewski & La Due 法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑤ γ -GTP	包接 L- γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑥ グルコース (Glu)	ヘキソキナーゼ法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑦ 総コレステロール (T-Cho)	酵素法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑧ トリグリセリド (TG)	遊離グリセロール消去法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑨ 総ビリルビン (T-Bil)	アゾビリルビン法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑩ 尿素窒素 (UN)	ウレアーゼ・インドフェノール法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑪ クレアチニン (Crea)	Jaffé法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑫ ナトリウム (Na)	炎光光度法 (自動炎光光度計 480 型、コーニング)
⑬ カリウム (K)	炎光光度法 (自動炎光光度計 480 型、コーニング)
⑭ クロール (Cl)	電量滴定法 (クロライドカウンター CL-6M、平沼産業)
⑮ カルシウム (Ca)	OCPC 法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑯ 無機リン (IP)	Fiske-SubbaRow 法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑰ 総蛋白 (TP)	ビウレット法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)

- | | |
|-------------------------|--|
| ⑮蛋白分画(Protein fraction) | セルロースアセテート膜電気泳動法
(全自動電気泳動装置 CTE-150、常光) |
| ⑯ A/G 比(A/G) | セルロースアセテート膜電気泳動法
(全自動電気泳動装置 CTE-150、常光) |

7) 剖検

全例について、投与 28 日あるいは回復 14 日の翌日に剖検した。剖検時には、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後、放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。全例について以下の器官・組織を 10% 中性緩衝ホルマリンに固定・保存した。なお、眼球およびハーダー腺はデビッドソン液で固定・保存し、精巣および精巣上体はブアン液で固定後 70% エタノールに保存した。

脳、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む、左右)、副腎(左右)、脾臓、心臓、大動脈、舌、食道、胃、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、喉頭、気管、肺(気管支を含む)、腎臓(左右)、膀胱、精巣(左右)、精巣上体(左右)、前立腺、精囊および凝固腺(左右)、卵巢(左右)、子宮(角部および頸部)、膣、眼球およびハーダー腺(左右)、乳腺(原則として腹部、雌のみ)、皮膚、胸骨および大腿骨(骨髄を含む)、脊髄(頸部)、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節(左右)、顎下腺(左右)、舌下腺(左右)、耳下腺(左右)、骨格筋(右大腿部)および坐骨神経(右)。

他に、剖検時に被験物質投与群で腸間膜に着色が認められたため、全例の腸間膜を採取して保存した。

8) 器官重量測定

全例について、剖検時に電子天秤(ER-180A、エー・アンド・デイ株式会社)を用いて以下の器官の重量を測定した。左右の表示のある器官については、左右別々に測定し、その合計値を算出した。

脳、肺、心臓、肝臓、腎臓(左右)、脾臓、副腎(左右)、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体含む、左右)、精巣(左右)、精巣上体(左右)、卵巢(左右)

個々の器官重量と剖検日に測定した動物体重に基づいて、器官体重重量比を以下の計算式により算出した。

$$\text{器官体重重量比} = (\text{器官重量} / \text{動物体重}) \times 100$$

9) 病理組織学的検査

全例について剖検時に固定・保存した全器官・組織について、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製して鏡検した。鏡検は対照群および 1000 mg/kg 投与群の全例について行った。

5. 統計学的方法

体重、体重増加量および増加率、摂餌量、尿検査の定量的項目(尿比重を除く)、血液学的検査(白血球百分比を除く)、血液化学的検査、器官重量および器官体重重量比の成績について群毎の平均値および標準偏差を算出し、項目毎に Bartlett の検定法を行い、等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合は Dunnett の検定法を用いて対照群との比較を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合は Mann-Whitney の U-検定法を用い対照群との比較を行った。

尿検査の定性的項目、尿比重および白血球百分比の成績については、群毎の傾向を Kruskal-Wallis の検定法で解析し、有意差がみられた場合は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照群との比較を行った。

なお、対照群との比較検定については、有意水準を 5%および 1%とした。

成 績

1. 一般状態

一般状態の成績を Table 2、INDIVIDUAL DATA 1-1-1~1-2-4 に示す。

投与期間、回復期間いずれにおいても、各投与群の雌雄ともに異常は認められなかった。

2. 体重

体重推移を Figure 1 および 2、Table 3 および 4、INDIVIDUAL DATA 2-1-1~2-4-2 に示す。

(1) 投与期間

250 mg/kg 投与群の雄で、各測定日の平均体重に対照群と比較して有意差は認められなかったが、投与 28 日間の体重増加量および体重増加率に有意な高値が認められた。

他の投与群には、各測定日の平均体重、投与 28 日間の体重増加量および体重増加率いずれにおいても有意差は認められなかった。

(2) 回復期間

1000 mg/kg 投与群の雌雄ともに、各測定日の平均体重、回復 14 日間の体重増加量および体重増加率いずれにおいても有意差は認められなかった。

3. 摂餌量

摂餌量を Figure 3 および 4、Table 5 および 6、INDIVIDUAL DATA 3-1-1~3-4-2 に示す。

(1) 投与期間

250 mg/kg 投与群の雄で投与 28 日に対照群と比較して有意な増加が認められた。

他の投与群には、各測定日に有意差は認められなかった。

(2) 回復期間

1000 mg/kg 投与群の雌雄ともに、各測定日に有意差は認められなかった。

4. 尿検査

尿検査および採尿中の飲水量の成績を Table 7～10、INDIVIDUAL DATA 4-1-1～4-4-2 に示す。

投与期間、回復期間いずれにおいても、雌雄の各投与群に对照群と比較して有意差の認められる項目はなかった。

5. 血液学的検査

血液学的検査の成績を Table 11～14、INDIVIDUAL DATA 5-1-1～5-4-4 に示す。

(1) 投与期間終了時

250 mg/kg 投与群では、雌雄とも对照群と比較して有意な変化は認められなかった。

500 mg/kg 投与群では、雄で赤血球数およびヘマトクリット値に有意な低値が認められた。

雌では有意な変化は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群では、雄でヘマトクリット値の有意な低値、雌で平均赤血球ヘモグロビン量の有意な低値が認められた。

(2) 回復期間終了時

1000 mg/kg 投与群では、雌雄ともに平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量の有意な低値が認められ、雄で好酸球百分比の有意な高値、雌でヘモグロビン量の有意な低値も認められた。

6. 血液化学的検査

血液化学的検査の成績を Table 15～18、INDIVIDUAL DATA 6-1-1～6-4-4 に示す。

(1) 投与期間終了時

250 mg/kg 以上の投与群の雄で、 γ -グロブリン分画比に对照群と比較して有意な低値が認められた。250 mg/kg 投与群の雌では、クレアチニン濃度の有意な高値が認められた。

500 mg/kg 投与群では、雌でカリウム濃度の有意な高値が認められた。

1000 mg/kg 投与群では、雄で α_2 -グロブリン分画比の有意な高値が、雌で γ -GTP 活性の有意な高値が認められた。

(2) 回復期間終了時

1000 mg/kg 投与群では、雄で有意差のみられる項目は認められなかったが、雌でトリグリセリド濃度の有意な低値および無機リン濃度の有意な高値が認められた。

7. 剖検

剖検所見を Table 19 および 20、INDIVIDUAL DATA 7-1-1～7-4-2 に示す。

(1) 投与期間終了時

250 mg/kg 以上の投与群の雄および 500 mg/kg 以上の投与群の雌で、空腸・回腸の内容物が赤紫色を呈し、用量の増加に伴いその例数が増加した。また、250 mg/kg 以上の投与群の雌雄

ともに、ほぼ全例に盲腸内容物の暗緑色化が認められ、空腸・回腸および腹腔内脂肪織の淡赤色化が認められた。空腸・回腸の淡赤色化は、用量の増加に伴い例数が増加し、腹腔内脂肪織の淡赤色化はほぼ全例に認められた。さらに、250 mg/kg 投与群の雌 1 例 (No. 252) と、500 mg/kg 以上の投与群の雌雄に、ほぼ全例で全身の皮下織の淡赤色化が認められた。

他に、250 mg/kg 投与群の雄 1 例 (No. 201) に左側甲状腺の無形成が認められた。

(2) 回復期間終了時

1000 mg/kg 投与群の雌雄ともに、全身の皮下織および腹腔内脂肪織の淡赤色化が全例に認められた。

他に、1000 mg/kg 投与群の雄 1 例 (No. 413) に肝臓の外側左葉の小型が認められた。

8. 器官重量および器官体重重量比 (絶対重量および相対重量)

絶対重量および相対重量の成績を Table 21~24、INDIVIDUAL DATA 8-1-1~8-4-4 に示す。

(1) 投与期間終了時

250 mg/kg 以上の投与群で、雄の肝臓の絶対および相対重量に对照群と比較して有意な高値が認められた。また、250 mg/kg 投与群の雄で副腎の絶対重量に有意な高値が認められた。一方、雌には有意な変化は認められなかった。

500 mg/kg 以上の投与群で、雌雄の胸腺の絶対および相対重量に有意な低値あるいは低値傾向が認められた。

1000 mg/kg 投与群で、雌の肝臓の相対重量に有意な高値がみられ、絶対重量にも高値傾向が認められた。また、雌の卵巣の相対重量有意な低値がみられ、絶対重量にも低値傾向が認められた。

(2) 回復期間終了時

1000 mg/kg 投与群では、雄の肝臓の絶対重量に有意な高値、相対重量に高値傾向がみられたが、雄の脾臓の絶対重量には低値傾向、相対重量には有意な低値が認められた。一方、雌の下垂体の絶対および相対重量のいずれにも有意な低値が認められた。

9. 病理組織学的検査

病理組織学的検査所見を Table 25 および 26、INDIVIDUAL DATA 9-1-1~9-4-2 に示す。

(1) 投与期間終了時

1000 mg/kg 投与群では、デイスパーズレッド 206 投与の影響は認められず、雄 1 例 (No. 404) と雌 2 例 (No. 457、452) の腎臓、肝臓、下垂体などに軽度な変化が散見されたのみであった。また、对照群でも、雄 3 例 (No. 101、103、105) と雌 1 例 (No. 156) の肝臓、腎臓などに軽度な変化が散見された。

(2) 回復期間終了時

1000 mg/kg 投与群では、投与期間終了時と同様にデイスパーズレッド 206 投与の影響は認められず、雄 3 例 (No. 413、415、417) の肺、肝臓、腎臓などに軽度な変化が散見されたのみで

あり、雌には変化は認められなかった。また、対照群でも、雄3例(No. 114、115、116)と雌3例(No. 162、166、167)の肺、肝臓、脾臓、腎臓などに軽度な変化が散見された。

考 察

ディスパーズレッド206の0(対照群)、250、500および1000 mg/kgを1群につき雌雄各7匹のCrj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与してその毒性を検討した。また、投与終了の翌日から0および1000 mg/kg投与群の雌雄各7匹について14日間観察を継続し、投与期間中にみられた毒性の回復性についても検討した。

一般状態には、投与期間、回復期間いずれにおいても、各投与群の雌雄ともに異常は認められなかった。

体重では、各投与群の雌雄ともに平均体重には有意差は認められなかった。250 mg/kg投与群の雄で投与期間中の体重増加量および体重増加率に有意な高値が認められたが、雌では変化がなく、雌雄の500 mg/kg以上の投与群にも変化がないことから、毒性学的意義はないと判断した。一方、回復期間中には、有意差は認められなかった。

摂餌量についても、体重と同様に250 mg/kg投与群の雄で投与28日に摂餌量の有意な増加が認められたが、雌では変化がなく、雌雄の500 mg/kg以上の投与群にも変化がないことから、毒性学的意義はないと判断した。一方、回復期間中には、有意差は認められなかった。

尿検査では、投与期間、回復期間いずれにおいても、各投与群の雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学的検査では、250 mg/kg投与群の雌雄ともに有意差は認められなかった。500 mg/kg投与群では、雄に赤血球数およびヘマトクリット値の有意な低値が認められ、1000 mg/kg投与群でも、雄にヘマトクリット値の有意な低値、雌に平均赤血球ヘモグロビン量の有意な低値が認められた。これらの変化はディスパーズレッド206と同様にアゾ基を持つPonceau 3R、Yellow ABなどのアゾ色素で肝障害、成長抑制あるいは貧血などが報告されている²⁾ことから、ディスパーズレッド206に起因して発現した貧血と考えられた。この貧血は、回復期間終了時にも回復することなく認められた。

一方、回復期間終了時に1000 mg/kg投与群の雄で好酸球百分比の有意な高値(平均値1.3%、個体変動範囲0~3%)が認められたが、この変化は生理学的変動範囲内(平均値0.9%、個体変動範囲0~3%)の値であることから、毒性学的意義はないと考えられた。

血液化学的検査では、投与期間終了時に雄の250 mg/kg以上の投与群に、 γ -グロブリン分画比の有意な低値が認められ、この分画が免疫グロブリンの存在する部分であること、500 mg/kg以上の投与群で胸腺の絶対重量が雌雄ともに低値傾向を示していることから、免疫機能の低下によ

る可能性が考えられた。しかし、白血球数およびリンパ球百分比などに変化がなく、病理組織学的検査においても免疫機能の低下を示唆する変化は認められないことから、この変化は極軽微なものと考えられた。

他に、雌雄の投与群にクレアチニン濃度、カリウム濃度、 α_2 -グロブリン分画比、 γ -GTP 活性などの有意差が散見されたが、この有意差は投与量の増加に伴う変化ではないこと、また肝臓、腎臓などに病理組織学的にも変化が認められないことから、いずれも毒性学的意義はないと考えられた。また、回復期間終了時には 1000 mg/kg 投与群の雌でトリグリセリド濃度の有意な低値が認められたが、この変化は背景データの変動範囲内のものであり、毒性学的意義はないと考えられた。一方、1000 mg/kg 投与群の雌で無機リン濃度の有意な高値が認められたが、ディスパーズレッド 206 投与の影響である可能性が示唆された。

剖検では、250 mg/kg 以上の投与群の雌雄ともに消化管(空腸・回腸・盲腸)の内容物や器官および組織(空腸・回腸・腹腔内脂肪織・全身の皮下織)の赤色あるいは暗緑色の変色が認められた。この変化は消化管から吸収された被験物質そのものの色調を反映したものであり、病理組織学的にも変化が認められないことから、この色調の変化自体には毒性学的意義はないと考えられた。全身の皮下織および腹腔内脂肪織には回復期間終了時にも雌雄の 1000 mg/kg 投与群に同様の変化が認められたが、この変化も吸収された被験物質が残存しているものと考えられた。

一方、投与期間終了時に 250 mg/kg 投与群の雄 1 例に左側甲状腺の無形成、回復期間終了時に 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に肝臓の外側左葉の小型(病理組織学的には限局性の線維化)がみられたが、いずれも当該例にのみ認められていることから、先天性あるいは自然発生性の変化と考えられた。

器官重量では、250 mg/kg 以上の投与群の雄および 1000 mg/kg 投与群の雌で、肝臓の絶対および相対重量に有意な高値あるいは高値傾向がみられた。雄で 250 あるいは 500 mg/kg 投与群にも有意差がみられていることについては、本試験における雄の対照群の体重が低値であることに起因する可能性も考えられたが、被験物質の影響も否定することはできなかった。また、250 mg/kg 投与群の雄に副腎の絶対重量の高値がみられたが、投与量の増加に応じた変化ではなかった。1000 mg/kg 投与群の雌に卵巣の絶対および相対重量に低値傾向または低値が認められたが、その発現機序を明らかにすることはできなかった。

一方、回復期間終了時には、1000 mg/kg 投与群の雄で脾臓の相対重量に低値が認められた。この変化は、投与期間終了時に胸腺重量の低値等により免疫機能の低下が示唆されていることから、ディスパーズレッド 206 による影響と考えられた。

病理組織学的検査では、剖検時に変色のみられた空腸・回腸および腹腔内脂肪織、重量増加のみられた肝臓、甲状腺および副腎、重量低下のみられた胸腺にも、投与期間および回復期間いずれにも被験物質投与に関連する所見は認められなかった。

以上のことより、雄では 250 mg/kg 以上の投与群で肝臓重量の高値ならびに γ -グロブリン分画比の低値、雌では 500 mg/kg 以上の投与群で胸腺重量の低値など被験物質投与による影響が認められていることから、本試験条件下におけるディスパーズレッド 206 の無影響量 (NOEL) は、雄で 250 mg/kg/day 未満、雌で 250 mg/kg/day と考えられた。

参考文献

- 1) ディスパーズレッド 206 のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験のための予備試験 (SR-9986P) : 最終報告書、株式会社 化合物安全性研究所 (2000)
- 2) 浦口 健二、上野 芳夫、北川 晴雄、粕谷 豊、酒井 文徳 編. トキシコロジー 毒理学の基本的問題点とその実際. 地人書館. p. 978. (1978)

Figures

Figure 1 Body weight changes of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Figure 2 Body weight changes of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Figure 3 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Figure 4 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

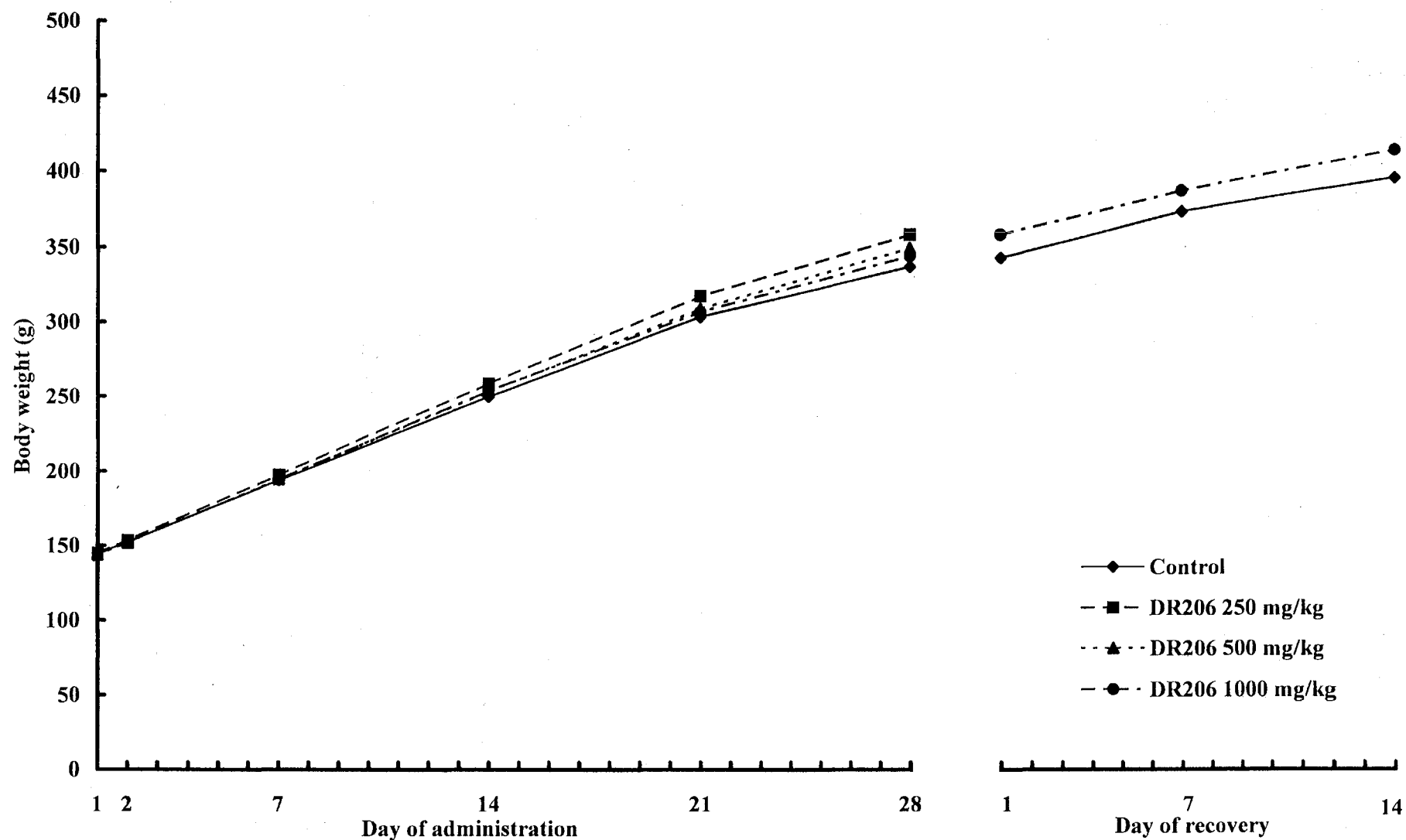


Figure 1 Body weight changes of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

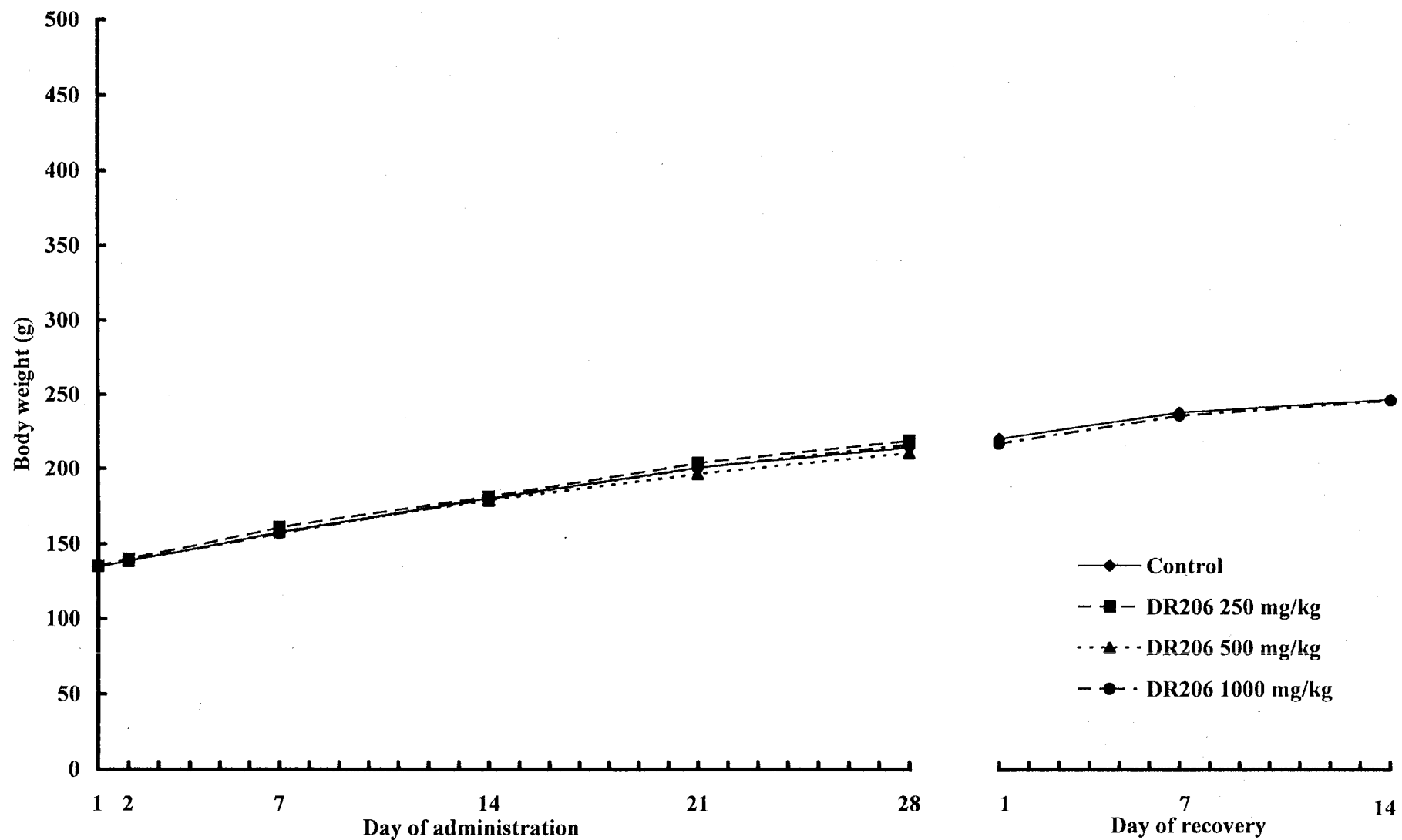


Figure 2 Body weight changes of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

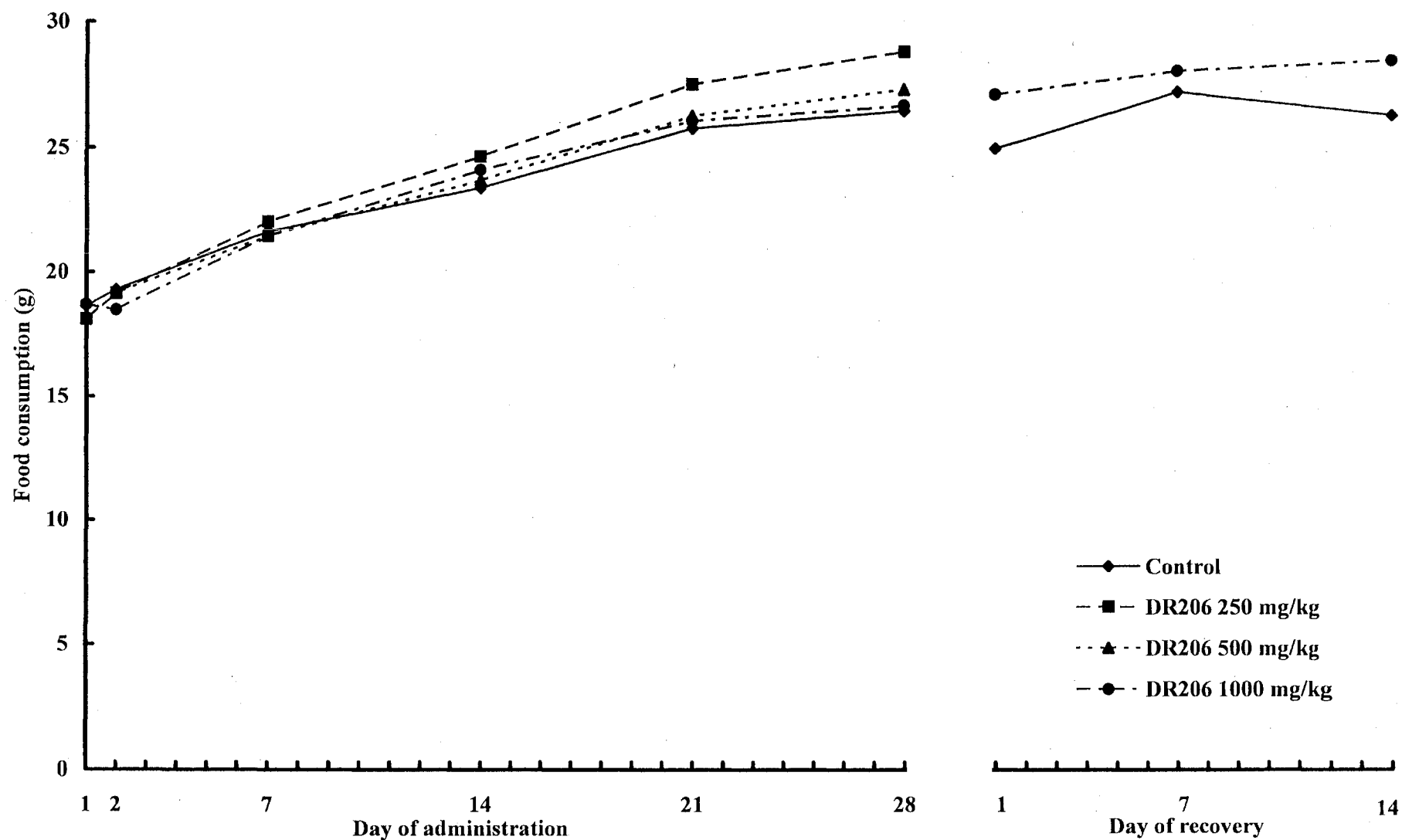


Figure 3 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

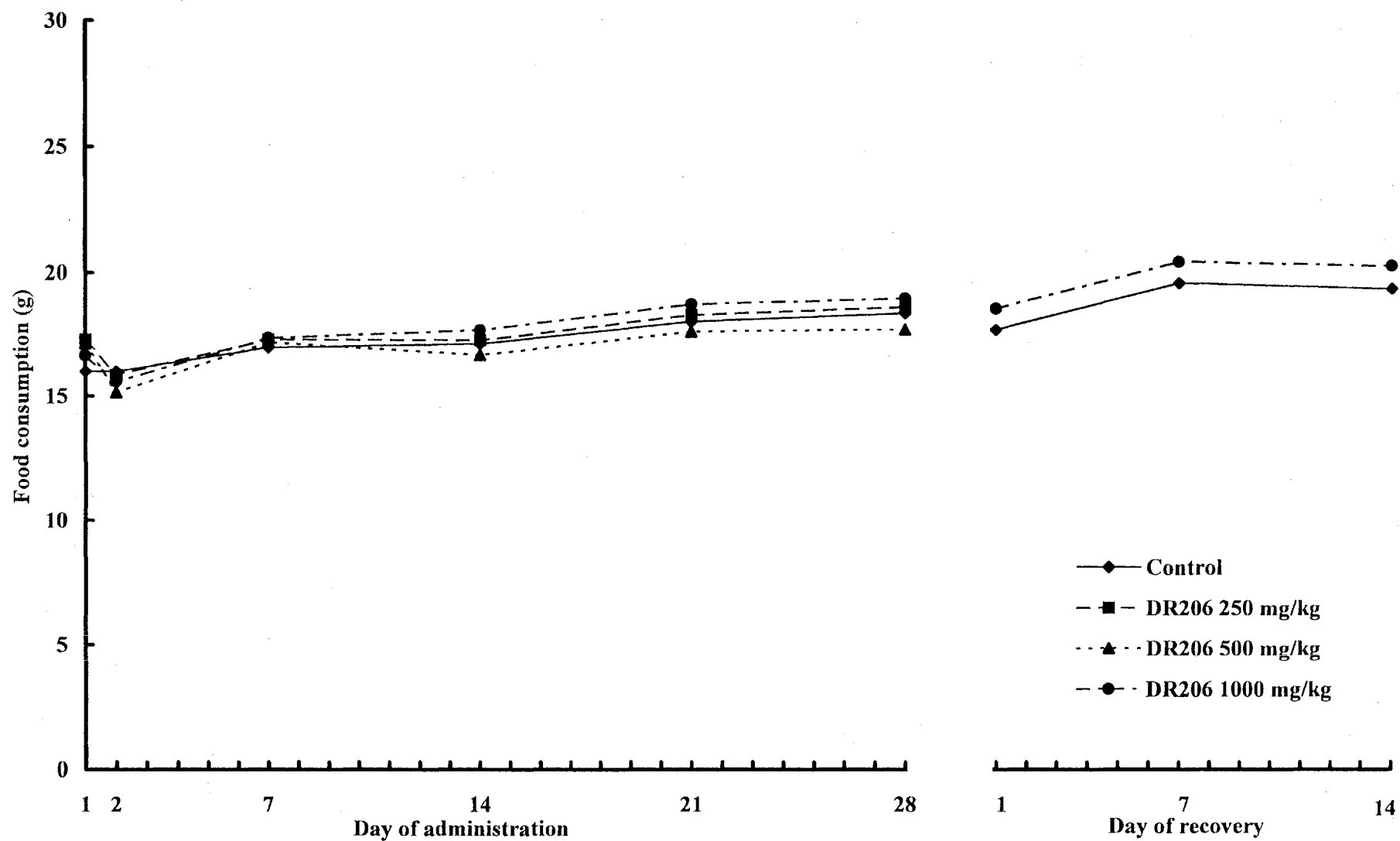


Figure 4 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Tables

- Table 1 Experimental design for 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) in rats (SR-9986)
- Table 2 General appearance of rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 3 Body weight changes of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 4 Body weight changes of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 5 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 6 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 7 Urinary findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 8 Urinary findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 9 Urinary findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 10 Urinary findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 11 Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 12 Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 13 Hematological findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 14 Hematological findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 15 Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)
- Table 16 Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 17 Biochemical findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 18 Biochemical findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 19 Gross findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 20 Gross findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 21 Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 22 Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 23 Absolute and relative organ weights of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 24 Absolute and relative organ weights of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 25 Histopathological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 26 Histopathological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Table 1 Experimental design for 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) in rats (SR-9986)

Group	Concentration	Volume mL/kg	Number of animals ^a (Animal number)	
	of DR206 mg/mL		Male	Female
<Administration period>				
Control ^b	0	5	7 (101~107)	7 (151~157)
DR206 ^c 250 mg/kg	50	5	7 (201~207)	7 (251~257)
DR206 500 mg/kg	100	5	7 (301~307)	7 (351~357)
DR206 1000 mg/kg	200	5	7 (401~407)	7 (451~457)
<Recovery period>				
Control	0	5	7 (111~117)	7 (161~167)
DR206 1000 mg/kg	200	5	7 (411~417)	7 (461~467)

a: Crj:CD(SD)IGS rats were dosed orally for 28 days from the age of 5 weeks.

b: Rats in the control group were dosed with 0.5% methylcellulose solution.

c: DR206 was suspended in 0.5% methylcellulose solution.

Table 2 General appearance of rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206)(SR-9986)

Sex	Group	Findings	Day of administration	Autopsy day	Day of recovery	Autopsy day
			1-28		1-14	
Male	Control	Number of animals examined	14	7	7	7
		No abnormal findings	14	7	7	7
	DR206 250 mg/kg	Number of animals examined	7	7	-	-
		No abnormal findings	7	7	-	-
	DR206 500 mg/kg	Number of animals examined	7	7	-	-
		No abnormal findings	7	7	-	-
	DR206 1000 mg/kg	Number of animals examined	14	7	7	7
		No abnormal findings	14	7	7	7
Female	Control	Number of animals examined	14	7	7	7
		No abnormal findings	14	7	7	7
	DR206 250 mg/kg	Number of animals examined	7	7	-	-
		No abnormal findings	7	7	-	-
	DR206 500 mg/kg	Number of animals examined	7	7	-	-
		No abnormal findings	7	7	-	-
	DR206 1000 mg/kg	Number of animals examined	14	7	7	7
		No abnormal findings	14	7	7	7

-: Blank value

Table 3 Body weight changes of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		Body weight (g) on day of administration						Body weight gain	
									Day 1-28	
			1	2	7	14	21	28	g	%
Control	14	Mean	144.6	152.4	193.8	249.9	303.6	337.1	192.4	133.088
		S.D.	4.1	4.4	6.9	9.2	12.9	17.3	16.2	11.198
DR206 250 mg/kg	7	Mean	144.9	153.4	197.4	258.7	317.3	358.4	213.6*	147.376*
		S.D.	4.5	5.0	8.4	9.7	13.5	16.2	12.4	5.629
DR206 500 mg/kg	7	Mean	143.7	151.9	194.6	253.4	308.9	349.6	205.9	143.027
		S.D.	4.8	5.5	11.4	17.8	23.1	25.8	21.7	11.481
DR206 1000 mg/kg	14	Mean	144.2	151.9	194.4	253.9	307.0	344.2	200.0	138.726
		S.D.	4.7	5.0	7.6	13.1	18.0	21.9	20.5	14.021

Group	Number of animals		Body weight (g) on day of recovery			Body weight gain	
						Day 1-14	
			1	7	14	g	%
Control	7	Mean	343.0	373.7	395.7	52.7	15.356
		S.D.	14.8	18.0	18.5	4.6	0.995
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	358.4	387.3	413.9	55.4	15.467
		S.D.	20.2	25.2	24.4	8.9	2.451

Body weight gain (%) = (Body weight gain / body weight on day 1) x 100.

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

Table 4 Body weight changes of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		Body weight (g) on day of administration						Body weight gain	
									Day 1-28	
			1	2	7	14	21	28	g	%
Control	14	Mean	134.2	138.6	157.6	179.9	200.7	214.6	80.4	59.971
		S.D.	3.9	3.8	5.9	9.9	11.3	14.8	14.4	10.769
DR206 250 mg/kg	7	Mean	134.9	139.9	160.9	181.1	204.0	219.1	84.3	62.351
		S.D.	4.6	4.0	8.1	9.6	14.4	16.0	12.0	7.228
DR206 500 mg/kg	7	Mean	134.9	138.4	158.0	178.7	196.6	210.9	76.0	56.264
		S.D.	8.5	8.9	11.5	14.7	17.6	18.0	11.4	6.628
DR206 1000 mg/kg	14	Mean	134.4	138.4	156.9	179.4	200.6	216.6	82.2	60.887
		S.D.	6.2	6.8	12.0	11.8	19.6	23.6	18.8	11.659

Group	Number of animals		Body weight (g) on day of recovery			Body weight gain	
						Day 1-14	
			1	7	14	g	%
Control	7	Mean	220.4	238.4	247.3	26.9	12.171
		S.D.	4.9	10.5	7.9	4.1	1.742
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	217.0	236.3	246.4	29.4	13.529
		S.D.	17.1	19.9	21.6	7.2	2.976

Body weight gain (%) = (Body weight gain / body weight on day 1) x 100.

Table 5 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		Food consumption (g/day) on day of administration					
			1	2	7	14	21	28
Control	14	Mean	18.64	19.29	21.63	23.40	25.80	26.49
		S.D.	1.15	1.54	1.24	1.18	1.22	1.59
DR206 250 mg/kg	7	Mean	18.14	19.14	22.03	24.66	27.53	28.83*
		S.D.	0.90	1.07	1.11	1.11	1.30	2.36
DR206 500 mg/kg	7	Mean	18.14	19.14	21.46	23.70	26.29	27.34
		S.D.	0.90	1.68	1.27	1.65	1.72	2.15
DR206 1000 mg/kg	14	Mean	18.71	18.50	21.44	24.11	26.09	26.69
		S.D.	1.49	1.45	1.17	1.64	2.02	2.20

Group	Number of animals		Food consumption (g/day) on day of recovery		
			1	7	14
Control	7	Mean	25.00	27.24	26.31
		S.D.	2.83	1.04	1.26
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	27.14	28.06	28.47
		S.D.	1.86	2.00	2.34

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

Table 6 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		Food consumption (g/day) on day of administration					
			1	2	7	14	21	28
Control	14	Mean	16.00	16.00	16.99	17.13	18.03	18.39
		S.D.	0.88	0.96	1.05	1.12	1.33	1.81
DR206 250 mg/kg	7	Mean	17.29	15.86	17.31	17.27	18.31	18.64
		S.D.	0.95	1.07	1.23	1.39	1.81	1.63
DR206 500 mg/kg	7	Mean	17.14	15.14	17.20	16.67	17.63	17.73
		S.D.	2.61	2.41	1.89	1.42	1.90	2.09
DR206 1000 mg/kg	14	Mean	16.64	15.57	17.37	17.68	18.74	18.98
		S.D.	1.74	1.74	1.50	1.40	2.10	2.21

Group	Number of animals		Food consumption (g/day) on day of recovery		
			1	7	14
Control	7	Mean	17.71	19.61	19.37
		S.D.	1.11	1.50	1.17
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	18.57	20.46	20.29
		S.D.	2.30	1.79	1.89

Table 7 Urinary findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals	pH				Protein			Glucose	Ketone body	Urobili-nogen	Bili-rubin	Occult blood		Color
		7.0	7.5	8.0	8.5	±	+	++	—	—	0.1 EU/dL	—	—	++	Λ
Control	14	0	0	2	12	1	13	0	14	14	14	14	13	1	14
DR206 250 mg/kg	7	0	1	3	3	3	4	0	7	7	7	7	7	0	7
DR206 500 mg/kg	7	0	0	1	6	0	6	1	7	7	7	7	7	0	7
DR206 1000 mg/kg	14	1	0	5	8	2	11	1	14	14	14	14	14	0	14

Group	Number of animals	Urinary sediments										Urine volume (mL/24hr., mean±S.D.)	Water consumption (g, mean±S.D.)				
		RBC	WBC		Epithelial cell				Small round	Cast	Specific gravity						
			—	±	Squamous	Round	1.011-1.020	1.021-1.030			1.031-1.040			1.041-1.050	<1.050		
																—	±
Control	14	14	13	1	5	9	14	0	14	14	1	0	2	7	4	13.04±5.48	26.6±4.8
DR206 250 mg/kg	7	7	7	0	0	7	6	1	7	7	0	1	1	1	4	14.71±8.14	31.6±13.5
DR206 500 mg/kg	7	7	6	1	2	5	7	0	7	7	0	0	0	3	4	11.00±1.80	27.9±2.5
DR206 1000 mg/kg	14	14	13	1	4	10	14	0	14	14	0	1	3	7	3	13.04±3.99	30.1±5.8

Color: A = Pale yellow or yellow.

Values are number of animals with findings.

Table 8 Urinary findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals	pH				Protein			Glucose	Ketone body	Urobilinogen	Bilirubin	Occult blood	Color
		6.5	7.5	8.0	8.5	—	±	+	—	—	0.1 EU/dL	—	—	A
Control	14	0	3	3	8	9	2	3	14	14	14	14	14	14
DR206 250 mg/kg	7	0	1	2	4	3	2	2	7	7	7	7	7	7
DR206 500 mg/kg	7	1	2	0	4	6	0	1	7	7	7	7	7	7
DR206 1000 mg/kg	14	0	1	2	11	6	5	3	14	14	14	14	14	14

Group	Number of animals	Urinary sediments										Urine volume (ml./21hr., mean±S.D.)	Water consumption (g, mean±S.D.)			
		RBC —	WBC		Epithelial cell			Cast —	Specific gravity							
			—	±	Squamous —	Round —	Small round —		1.011-1.020	1.021-1.030	1.031-1.040			1.041-1.050	<1.050	
Control	14	14	13	1	7	7	14	14	14	0	2	3	4	5	9.64±3.96	20.1±6.5
DR206 250 mg/kg	7	7	5	2	0	7	7	7	7	0	1	1	4	1	11.14±4.87	23.7±7.7
DR206 500 mg/kg	7	7	6	1	2	5	7	7	7	0	0	2	3	2	8.79±3.15	19.9±4.0
DR206 1000 mg/kg	14	14	14	0	6	8	14	14	14	1	1	4	4	4	10.21±4.03	18.5±7.3

Color: A = Pale yellow or yellow.

Values are number of animals with findings.

Table 9 Urinary findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals	pH			Protein			Glucose	Ketone body	Urobilinogen	Bilirubin	Occult blood			Color
		7.5	8.0	8.5	±	+	++	—	—	0.1 EU/dL	—	—	±	+	A
Control	7	0	2	5	2	4	1	7	7	7	7	6	0	1	7
DR206 1000 mg/kg	7	1	1	5	1	6	0	7	7	7	7	6	1	0	7

Group	Number of animals	Urinary sediments										Urine volume (ml./24hr., mean±S.D.)	Water consumption (g, mean±S.D.)		
		RBC —	WBC				Epithelial cell				Cast —				
			—	±	++	Squamous		Round —	Small round —						
						—	±								
										Specific gravity					
1.021-1.041	1.041-1.050	1.050<1.030	1.050												
Control	7	7	6	1	0	5	2	7	7	7	1	2	4	13.07±5.94	26.9±11.4
DR206 1000 mg/kg	7	7	4	2	1	6	1	7	7	7	0	4	3	14.79±3.19	34.1±4.0

Color: A = Pale yellow or yellow.

Values are number of animals with findings.

Table 10 Urinary findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals	pH					Protein			Glucose	Ketone body	Urobili-nogen	Bili-rubin	Occult blood	Color
		6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	—	±	+	—	—	0.1 EU/dL	—	—	A
Control	7	1	1	2	1	2	1	6	0	7	7	7	7	7	7
DR206 1000 mg/kg	7	1	1	2	3	0	1	4	2	7	7	7	7	7	7

Urinary sediments																
Group	Number of animals	RBC	WBC				Epithelial cell		Round	Small round	Cast	Specific gravity			Urine volume (mL/21hr., mean±S.D.)	Water consumption (g, mean±S.D.)
			—	±	+	++	Squamous	—				—	1.031- 1.041-	1.041- 1.050		
Control	7	7	3	1	2	1	2	5	7	7	7	2	3	2	9.36±3.31	19.6±9.2
DR206 1000 mg/kg	7	7	5	1	0	1	4	3	7	7	7	1	4	2	10.00±3.42	19.9±7.1

Color: A = Pale yellow or yellow.

Values are number of animals with findings.

Table 11 Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		RBC 10 ⁴ /μL	Ht %	Hb g/dL	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	WBC 10 ² /μL	Platelet 10 ⁴ /μL
Control	7	Mean	805.9	45.44	15.74	56.39	19.53	34.64	104.7	123.43
		S.D.	16.6	1.13	0.38	0.98	0.42	0.37	26.4	4.66
DR206 250 mg/kg	7	Mean	784.6	44.57	15.49	56.90	19.77	34.77	123.0	122.01
		S.D.	62.7	2.69	0.83	1.74	0.80	0.63	20.8	13.61
DR206 500 mg/kg	7	Mean	757.9**	43.27**	15.03	57.11	19.84	34.74	104.0	128.71
		S.D.	19.0	1.16	0.43	1.01	0.34	0.30	20.9	9.66
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	790.4	43.69**	15.16	55.27	19.17	34.70	119.0	120.19
		S.D.	18.6	0.58	0.45	0.91	0.48	0.94	36.6	12.23

Group	Number of animals		Reticu- locyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						
						Neutrophil		Eosino- phil	Basophil	Monocyte	Lympho- cyte	Others
						Stab form	Seg- mented					
Control	7	Mean	33.3	18.69	28.49	1.1	6.1	0.7	0.0	0.4	91.6	0.0
		S.D.	8.9	2.27	1.29	0.9	2.9	1.1	0.0	0.5	2.8	0.0
DR206 250 mg/kg	7	Mean	33.3	19.66	29.94	0.7	7.1	0.1	0.0	0.7	91.3	0.0
		S.D.	6.7	3.77	2.66	1.0	2.9	0.4	0.0	1.1	3.7	0.0
DR206 500 mg/kg	7	Mean	35.9	21.91	28.89	0.6	5.4	1.0	0.0	1.1	91.9	0.0
		S.D.	6.6	4.77	2.62	0.8	2.2	1.5	0.0	0.7	2.3	0.0
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	36.6	20.26	30.19	1.3	7.3	0.1	0.0	0.6	90.7	0.0
		S.D.	7.2	1.67	3.42	1.4	4.2	0.4	0.0	0.8	5.3	0.0

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

Table 12 Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		RBC 10 ⁴ /μL	Ht %	Hb g/dL	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	WBC 10 ² /μL	Platelet 10 ⁴ /μL
Control	7	Mean	786.9	44.43	15.74	56.50	20.00	35.44	87.4	112.71
		S.D.	39.6	1.93	0.62	1.31	0.33	0.60	28.0	14.99
DR206 250 mg/kg	7	Mean	788.0	44.16	15.64	56.03	19.87	35.44	71.3	120.11
		S.D.	42.2	2.48	0.65	1.72	0.43	0.72	23.3	9.83
DR206 500 mg/kg	7	Mean	784.9	43.07	15.33	54.89	19.53	35.61	73.9	119.91
		S.D.	24.0	1.90	0.48	0.92	0.32	0.73	21.3	13.78
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	795.4	43.49	15.44	54.69	19.44*	35.50	77.1	116.71
		S.D.	22.2	1.59	0.30	1.66	0.48	0.75	30.1	10.57

Differential count of WBC %												
Group	Number of animals		Reticu- locyte %	PT sec	APTT sec	Neutrophil		Eosino- phil	Basophil	Monocyte	Lympho- cyte	Others
						Stab form	Seg- mented					
Control	7	Mean	22.1	15.87	21.47	1.4	5.0	0.4	0.0	0.6	92.6	0.0
		S.D.	4.2	1.44	2.23	1.1	1.0	0.5	0.0	0.8	1.0	0.0
DR206 250 mg/kg	7	Mean	22.7	15.51	21.26	1.0	6.1	0.9	0.0	0.4	91.6	0.0
		S.D.	3.0	0.44	1.89	0.6	2.5	0.9	0.0	0.8	3.5	0.0
DR206 500 mg/kg	7	Mean	19.6	14.91	22.00	1.3	6.7	0.9	0.1	0.9	90.1	0.0
		S.D.	3.0	0.76	0.85	1.0	2.6	0.7	0.4	0.9	3.7	0.0
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	22.0	15.40	22.97	1.1	6.3	0.3	0.0	1.0	91.3	0.0
		S.D.	6.1	0.93	1.88	0.9	3.1	0.5	0.0	0.8	3.3	0.0

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

Table 13 Hematological findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		RBC	Ht	Hb	MCV	MCH	MCHC	WBC	Platelet
			10 ⁴ /μL	%	g/dL	fL	pg	g/dL	10 ² /μL	10 ⁴ /μL
Control	7	Mean	829.3	45.39	15.99	54.73	19.29	35.23	124.9	112.97
		S.D.	43.2	2.04	0.66	0.61	0.31	0.48	30.7	6.81
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	855.6	44.97	15.91	52.57**	18.60**	35.39	107.3	122.30
		S.D.	27.9	1.58	0.60	0.87	0.22	0.42	21.0	11.76

Group	Number of animals		Reticu- locyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						
						Neutrophil		Eosino- phil	Basophil	Monocyte	Lympho- cyte	Others
						Stab form	Seg- mented					
Control	7	Mean	25.0	18.11	25.91	1.0	6.0	0.3	0.0	1.0	91.7	0.0
		S.D.	4.0	2.52	1.71	0.6	3.7	0.5	0.0	0.8	3.4	0.0
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	25.0	17.61	26.26	0.9	5.3	1.3*	0.1	1.1	91.3	0.0
		S.D.	4.7	2.19	2.53	0.7	2.5	1.0	0.4	0.9	3.5	0.0

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

Table 14 Hematological findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		RBC	Ht	Hb	MCV	MCH	MCHC	WBC	Platelet
			10 ⁶ /μL	%	g/dL	fL	pg	g/dL	10 ² /μL	10 ⁴ /μL
Control	7	Mean	776.7	42.81	15.77	55.14	20.33	36.83	71.1	108.64
		S.D.	31.9	1.32	0.52	0.85	0.44	0.39	22.6	12.42
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	778.7	41.41	14.97*	53.19**	19.23**	36.17	74.7	114.47
		S.D.	34.9	2.22	0.64	1.15	0.59	0.75	25.4	10.75

Group	Number of animals		Reticu- locyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						
						Neutrophil		Eosino- phil	Basophil	Monocyte	Lympho- cyte	Others
						Stab form	Seg- mented					
Control	7	Mean	21.4	15.67	19.36	1.1	5.1	0.9	0.0	0.3	92.6	0.0
		S.D.	7.7	1.00	0.98	0.7	2.5	1.5	0.0	0.5	2.8	0.0
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	25.4	15.56	19.61	1.4	6.6	0.4	0.1	0.6	90.9	0.0
		S.D.	9.0	0.92	1.34	0.5	4.1	0.5	0.4	0.5	4.4	0.0

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

Table 15 Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		TP g/dL	A/G ratio	Protein fraction (%)					GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	LDH IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL	Glucose mg/dL
					Albumin	Globulin										
						α_1	α_2	β	γ							
Control	7	Mean	5.37	1.151	53.59	23.41	9.50	11.73	1.77	64.7	25.0	458.4	297.1	0.63	0.041	152.0
		S.D.	0.11	0.086	1.78	1.71	0.84	0.63	0.64	6.6	5.5	81.3	54.5	0.10	0.004	21.1
DR206 250 mg/kg	7	Mean	5.39	1.164	53.90	23.43	9.93	11.74	1.00*	60.1	22.0	405.1	272.3	0.61	0.037	150.9
		S.D.	0.23	0.067	1.42	1.04	0.66	0.60	0.64	3.8	5.8	53.2	43.4	0.12	0.008	20.2
DR206 500 mg/kg	7	Mean	5.26	1.216	54.93	21.81	9.96	12.31	0.99*	69.6	23.1	451.6	341.9	0.73	0.036	140.6
		S.D.	0.21	0.082	1.71	0.82	0.97	0.50	0.40	4.4	6.7	63.5	55.5	0.13	0.005	18.9
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	5.16	1.137	53.31	22.77	10.73*	12.39	0.80**	67.0	22.3	458.0	297.0	0.94	0.037	144.9
		S.D.	0.21	0.046	1.02	1.30	0.77	0.66	0.26	3.4	3.0	97.3	59.6	0.79	0.005	21.1

Group	Number of animals		T-Cho	TG	UN	Crea	Na	K	Cl	Ca	IP
			mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mEq/L	mEq/L	mEq/L	mg/dL	mg/dL
Control	7	Mean	61.3	31.6	15.59	0.434	142.57	4.656	106.1	9.43	8.19
		S.D.	6.5	16.2	1.12	0.065	1.74	0.291	1.9	0.17	0.78
DR206 250 mg/kg	7	Mean	58.7	35.7	14.63	0.394	142.43	4.631	104.9	9.63	8.11
		S.D.	13.2	12.3	1.25	0.031	1.10	0.248	0.9	0.29	0.60
DR206 500 mg/kg	7	Mean	64.4	34.7	14.41	0.379	142.86	4.679	106.7	9.54	8.40
		S.D.	14.3	12.9	1.42	0.020	1.11	0.158	1.6	0.30	0.65
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	65.4	30.6	15.37	0.397	142.29	4.714	106.4	9.29	8.23
		S.D.	12.2	15.6	1.31	0.024	1.47	0.237	1.1	0.16	0.57

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

Table 16 Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		TP g/dL	A/G ratio	Protein fraction (%)					GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	LDH IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL	Glucose mg/dL
					Albumin	Globulin										
						α_1	α_2	β	γ							
Control	7	Mean	5.67	1.421	58.71	20.04	8.17	11.19	1.89	58.4	20.6	236.9	322.4	0.99	0.053	124.1
		S.D.	0.26	0.127	2.16	1.16	0.63	1.21	1.17	4.8	6.0	50.4	43.1	0.21	0.013	12.8
DR206 250 mg/kg	7	Mean	5.70	1.381	57.97	20.83	8.30	11.30	1.60	64.1	20.0	279.3	323.0	1.03	0.056	122.7
		S.D.	0.24	0.149	2.52	1.29	0.98	0.68	0.43	6.5	4.0	61.3	54.0	0.29	0.008	12.8
DR206 500 mg/kg	7	Mean	5.61	1.476	59.49	19.46	8.07	11.50	1.49	65.6	19.7	229.0	319.3	0.91	0.046	122.6
		S.D.	0.40	0.195	3.00	2.55	0.80	0.81	0.44	6.4	2.1	63.6	62.8	0.13	0.005	19.0
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	5.64	1.440	59.06	18.80	8.60	11.99	1.56	66.6	22.7	274.3	273.9	1.36*	0.054	124.9
		S.D.	0.19	0.102	1.66	1.73	0.22	0.66	0.40	11.6	6.0	44.5	48.8	0.38	0.010	8.2

Group	Number of animals		T-Cho	TG	UN	Crea	Na	K	Cl	Ca	IP
			mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mEq/L	mEq/L	mEq/L	mg/dL	mg/dL
Control	7	Mean	59.6	12.3	16.81	0.430	142.21	4.567	108.1	9.47	6.93
		S.D.	9.2	6.0	2.00	0.032	0.70	0.164	1.5	0.42	0.76
DR206 250 mg/kg	7	Mean	63.6	13.6	17.26	0.476*	142.57	4.629	107.1	9.34	6.71
		S.D.	14.5	5.8	1.80	0.028	1.62	0.110	1.1	0.32	0.81
DR206 500 mg/kg	7	Mean	69.0	12.1	17.06	0.444	141.57	4.864*	108.6	9.29	6.94
		S.D.	14.1	4.3	2.46	0.036	1.30	0.268	1.0	0.28	0.80
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	68.4	18.4	15.24	0.447	143.00	4.607	108.7	9.33	6.84
		S.D.	23.3	7.0	1.89	0.028	1.26	0.274	3.1	0.23	0.61

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

Table 17 Biochemical findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		TP g/dL	A/G ratio	Protein fraction (%)					GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	LDH IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL	Glucose mg/dL
					Albumin	Globulin										
						α_1	α_2	β	γ							
Control	7	Mean	5.47	1.127	52.96	23.19	10.47	11.77	1.61	60.4	22.9	370.3	338.3	0.37	0.053	159.9
		S.D.	0.20	0.126	2.78	2.58	0.95	1.34	1.14	6.3	4.6	71.3	85.1	0.17	0.011	18.5
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	5.57	1.124	52.97	23.23	10.57	11.80	1.43	65.4	25.6	362.0	277.6	0.46	0.054	158.9
		S.D.	0.14	0.090	1.93	1.38	0.88	0.59	0.32	7.5	4.6	42.3	75.2	0.21	0.008	22.6
Group	Number of animals		T-Chol mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL					
Control	7	Mean	56.4	31.7	17.30	0.449	143.43	4.527	106.3	9.27	6.91					
		S.D.	16.5	10.8	2.31	0.051	0.73	0.203	1.6	0.10	0.42					
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	56.9	33.9	16.61	0.467	143.36	4.531	105.9	9.40	7.13					
		S.D.	12.4	15.8	1.90	0.059	1.57	0.341	0.9	0.26	0.54					

Table 18 Biochemical findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		TP g/dL	A/G ratio	Protein fraction (%)					GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	LDH IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL	Glucose mg/dL
					Albumin	Globulin										
						α_1	α_2	β	γ							
Control	7	Mean	5.67	1.399	58.37	18.74	8.10	12.00	2.79	56.1	19.7	198.7	292.4	0.70	0.071	146.7
		S.D.	0.22	0.093	1.59	1.41	0.57	0.87	0.92	6.0	3.8	53.8	55.9	0.19	0.015	12.8
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	5.67	1.431	58.91	19.14	7.76	11.90	2.29	56.9	18.1	218.9	268.6	0.86	0.071	132.6
		S.D.	0.29	0.117	1.96	2.09	0.69	1.37	1.00	6.2	2.0	45.5	51.2	0.23	0.021	14.7

Group	Number of animals		T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
Control	7	Mean	70.4	18.6	17.44	0.450	141.93	4.283	108.6	9.29	5.54
		S.D.	7.5	7.0	2.01	0.032	1.27	0.252	1.7	0.36	0.58
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	59.3	11.6*	16.44	0.479	141.57	4.491	108.9	9.43	6.16*
		S.D.	11.6	4.8	2.04	0.072	1.13	0.155	2.3	0.19	0.36

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

Table 19 Gross findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Item	End of administration				End of recovery	
	Control	DR206 (mg/kg)			Control	DR206 (mg/kg)
		250	500	1000		1000
Number of animals examined	7	7	7	7	7	7
Organ : Findings						
Jejunum and ileum : Pale red discoloration	0	1	4	5	0	0
Red purple contents	0	1	2	4	0	0
Cecum : Dark green discoloration, contents	0	6	7	7	0	0
Liver : Small size, lateral left lobe	0	0	0	0	0	1
Thyroid : Aplasia, unilateral	0	1	0	0	0	0
Subcutis, systemic : Pale red discoloration	0	0	6	7	0	7
Intra-abdominal adipose tissue : Pale red discoloration	0	7	7	7	0	7

Values are number of animals with findings.

Table 20 Gross findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Item	End of administration				End of recovery	
	Control	DR206 (mg/kg)			Control	DR206 (mg/kg)
		250	500	1000		1000
Number of animals examined	7	7	7	7	7	7
Organ : Findings						
Jejunum and/or ileum : Pale red discoloration	0	1	1	3	0	0
Red purple contents	0	0	1	3	0	0
Cecum : Dark green discoloration, contents	0	7	7	7	0	0
Subcutis, systemic : Pale red discoloration	0	1	7	7	0	7
Intra-abdominal adipose tissue : Pale red discoloration	0	6	7	7	0	7

Values are number of animals with findings.

Table 21 Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Lung		Brain		Pituitary gland	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
Control	7	Mean	309.7	9.446	3.051	2.436	0.786	0.630	0.203	1.096	0.354	1.197	0.386	2.024	0.656	11.16	3.603
		S.D.	21.6	0.686	0.087	0.193	0.046	0.074	0.016	0.106	0.017	0.124	0.024	0.067	0.041	1.08	0.255
DR206 250 mg/kg	7	Mean	325.3	11.191**	3.439**	2.713	0.836	0.729	0.224	1.124	0.346	1.299	0.399	2.037	0.627	11.11	3.426
		S.D.	11.5	0.807	0.175	0.194	0.048	0.059	0.024	0.108	0.028	0.130	0.034	0.063	0.026	0.99	0.381
DR206 500 mg/kg	7	Mean	316.6	10.691*	3.377**	2.630	0.831	0.687	0.217	1.070	0.340	1.250	0.396	2.031	0.644	10.69	3.376
		S.D.	26.6	1.009	0.149	0.231	0.041	0.110	0.031	0.078	0.019	0.089	0.017	0.070	0.056	1.13	0.183
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	305.6	10.874*	3.560**	2.473	0.809	0.650	0.213	1.047	0.341	1.256	0.410	2.031	0.667	10.27	3.369
		S.D.	22.3	1.044	0.266	0.295	0.073	0.061	0.021	0.086	0.020	0.175	0.037	0.105	0.022	0.63	0.187

Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Testis		Epididymis	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%
Control	7	Mean	556.0	178.284	17.87	5.781	47.3	15.229	2.764	0.894	0.673	0.217
		S.D.	152.7	40.521	4.57	1.457	7.2	1.717	0.285	0.099	0.050	0.020
DR206 250 mg/kg	7	Mean	549.6	169.439	18.44	5.673	61.0*	18.683	2.757	0.850	0.657	0.204
		S.D.	63.9	23.590	2.95	0.934	12.6	3.370	0.129	0.057	0.052	0.017
DR206 500 mg/kg	7	Mean	445.4	141.116	17.14	5.447	53.7	17.071	2.819	0.894	0.659	0.209
		S.D.	56.1	17.890	2.62	0.951	7.3	2.675	0.231	0.081	0.070	0.020
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	411.0*	135.047*	20.71	6.797	52.4	17.126	2.881	0.946	0.677	0.223
		S.D.	87.1	30.054	2.81	0.888	8.0	1.990	0.207	0.063	0.053	0.017

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

Table 22 Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Lung		Brain		Pituitary gland	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
Control	7	Mean	192.6	5.950	3.083	1.726	0.896	0.441	0.229	0.724	0.377	0.911	0.474	1.870	0.976	12.17	6.264
		S.D.	14.8	0.664	0.173	0.180	0.088	0.064	0.036	0.037	0.021	0.036	0.039	0.071	0.096	3.04	1.087
DR206 250 mg/kg	7	Mean	202.1	6.399	3.170	1.683	0.834	0.423	0.209	0.730	0.363	0.956	0.474	1.867	0.926	12.81	6.333
		S.D.	13.4	0.355	0.147	0.101	0.051	0.081	0.035	0.027	0.021	0.062	0.014	0.076	0.048	1.44	0.490
DR206 500 mg/kg	7	Mean	193.0	6.424	3.331	1.630	0.846	0.427	0.221	0.691	0.359	0.936	0.484	1.883	0.979	11.59	6.014
		S.D.	16.9	0.622	0.202	0.129	0.049	0.072	0.025	0.101	0.025	0.108	0.031	0.091	0.079	1.03	0.467
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	199.9	6.784	3.371*	1.729	0.869	0.446	0.221	0.733	0.367	0.926	0.466	1.881	0.953	11.53	5.789
		S.D.	26.3	1.366	0.228	0.188	0.062	0.092	0.025	0.077	0.020	0.098	0.028	0.052	0.110	1.75	0.671

Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Ovary	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Control	7	Mean	439.9	229.140	12.13	6.310	64.9	33.561	94.1	48.577
		S.D.	20.8	14.119	1.83	0.912	12.7	5.259	17.8	5.713
DR206 250 mg/kg	7	Mean	439.9	217.094	13.23	6.561	68.4	34.027	84.6	41.966
		S.D.	66.8	25.038	1.54	0.832	5.4	3.888	8.9	5.033
DR206 500 mg/kg	7	Mean	373.9*	192.241	12.71	6.576	64.9	33.837	87.4	45.371
		S.D.	85.4	27.938	2.33	1.001	7.4	4.901	12.1	5.937
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	379.4*	186.820*	13.83	6.973	66.6	33.280	80.4	40.380*
		S.D.	125.7	38.785	1.77	0.954	12.3	4.373	11.3	4.434

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

Table 23 Absolute and relative organ weights of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Lung		Brain		Pituitary gland	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
Control	7	Mean	365.3	10.493	2.877	2.757	0.754	0.693	0.189	1.144	0.316	1.277	0.350	2.074	0.569	11.67	3.201
		S.D.	21.0	0.904	0.255	0.248	0.061	0.057	0.016	0.085	0.035	0.066	0.014	0.085	0.030	0.81	0.232
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	383.7	11.496*	3.000	2.949	0.770	0.630	0.163**	1.209	0.314	1.356	0.351	2.093	0.547	12.56	3.283
		S.D.	25.3	0.586	0.107	0.267	0.057	0.061	0.014	0.084	0.010	0.124	0.024	0.048	0.026	1.20	0.350
Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Testis		Epididymis						
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%					
Control	7	Mean	461.4	125.783	17.53	4.841	57.0	15.733	2.939	0.807	0.904	0.247					
		S.D.	78.7	16.150	3.03	1.095	9.6	3.450	0.155	0.084	0.042	0.014					
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	495.1	129.570	20.64	5.351	54.7	14.340	2.959	0.774	0.964	0.251					
		S.D.	69.1	19.815	4.58	0.975	6.5	2.183	0.128	0.040	0.072	0.026					

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

**: Significantly different from the control at $p \leq 0.01$.

Table 24 Absolute and relative organ weights of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Disperse Red 206 (DR206) (SR-9986)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Lung		Brain		Pituitary gland	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
Control	7	Mean	227.7	6.481	2.847	1.759	0.773	0.486	0.213	0.771	0.340	0.994	0.437	1.913	0.840	14.57	6.400
		S.D.	6.4	0.401	0.194	0.124	0.049	0.053	0.024	0.047	0.022	0.032	0.021	0.110	0.042	1.08	0.452
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	227.1	6.539	2.883	1.746	0.771	0.479	0.210	0.779	0.341	0.984	0.434	1.877	0.831	12.84*	5.663*
		S.D.	18.2	0.574	0.216	0.164	0.084	0.061	0.027	0.063	0.013	0.079	0.021	0.066	0.079	1.59	0.681

Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Ovary	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Control	7	Mean	382.9	168.254	13.80	6.051	63.3	27.853	85.9	37.727
		S.D.	62.9	27.727	3.58	1.523	5.4	3.032	11.0	4.902
DR206 1000 mg/kg	7	Mean	393.3	172.554	14.16	6.264	69.0	30.551	93.1	41.401
		S.D.	70.5	24.513	1.81	0.866	6.9	4.144	12.1	7.498

*: Significantly different from the control at $p \leq 0.05$.

Table 25 Histopathological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206(DR206) (SR-9986)

Item		End of administration				End of recovery	
		Control	DR206(mg/kg)			Control	DR206(mg/kg)
			250	500	1000		1000
Number of animals examined		7	0	0	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Lung: Accumulation, foam cell	+	0	-	-	0	1	2
Cellular infiltration, lymphocyte	+	0	-	-	0	0	1
Pancreas: Atrophy, acinar cell	+	0	-	-	0	1	0
Liver: Microgranuloma	+	1	-	-	0	0	0
Fibrosis, focal	+	0	-	-	0	0	1
Kidney: Regeneration, tubular epithelium	+	1	-	-	0	0	0
Cast, hyaline	+	0	-	-	1	0	0
Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	+	0	-	-	0	1	2
Prostate: Cellular infiltration, lymphocyte	+	1	-	-	1	0	0

There were no abnormal findings in the trachea, larynx, tongue, parotid gland, submandibular gland, sublingual gland, esophagus, forestomach, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, heart, thoracic aorta, urinary bladder, testis, epididymis, seminal vesicle, coagulating gland, cerebrum, cerebellum, spinal cord, sciatic nerve, spleen, thymus, bone marrow(sternum and femur), submandibular lymph node, mesenteric lymph node, pituitary gland, thyroid, parathyroid, adrenal, eyeball, Harderian gland, skeletal muscle, sternum, femur, skin or mesenterium.

Grade; +: slight change.

Values are number of animals with findings.

-: blank value.

Table 26 Histopathological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Disperse Red 206(DR206) (SR-9986)

Item		End of administration			End of recovery	
		Control	DR206(mg/kg)		Control	DR206(mg/kg)
			250	500		1000
Number of animals examined		7	0	0	7	7
Organ: Findings	Grade					
Liver: Erythrophagia, Kupffer cell	+	1	-	-	0	0
Fatty change, periportal	+	0	-	-	0	0
Microgranuloma	+	0	-	-	1	0
Kidney: Mineralization, papilla	+	0	-	-	1	0
Pituitary gland: Cyst, pars distalis	<+>	0	-	-	0	0
Eyeball: Atrophy, retina	+	0	-	-	1	0

There were no abnormal findings in the lung, trachea, larynx, tongue, parotid gland, submandibular gland, sublingual gland, esophagus, forestomach, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, pancreas, heart, thoracic aorta, urinary bladder, ovary, uterus, vagina, cerebrum, cerebellum, spinal cord, sciatic nerve, spleen, thymus, bone marrow(sternum and femur), submandibular lymph node, mesenteric lymph node, thyroid, parathyroid, adrenal, Harderian gland, skeletal muscle, sternum, femur, skin, mammary gland or mesenterium.

Grade; +: slight change, <+>: presence in "presence or not" basis.

Values are number of animals with findings.

-: blank value.