最終報告書

試験名:モルダントブラック-7 のラットを用いた 2 週間回復性観察を含む 28 日間反復経口投与毒性試験

試験番号:B-6586

試験実施施設 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室 〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

> 株式会社ボゾリサーチセンター 〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

2. 目次

2.	目次		3
3.	試験	実施概要	7
	3.1	試験計画書	7
	3.2	試験目的	7
	3.3	試験委託者	7
	3.4	試験受託者	7
	3.5	試験実施施設	7
4.	THE STATE OF THE S	1	
5.		1	
6.	201700000000	材料及び方法1	
	6.1	被験物質及び媒体1	
	6.1.1	被験物質1	
	6.1.2		
	6.2	投与液の調製1	
	6.2.1	投与液の保存方法1	13
	6.2.2	200 1 - 200 = -	
	6.2.3	被験液の濃度・均一性確認	13
	6.3	試験動物種及び系統の選択理由1	
	6.4	試験動物及び群分け1	4
	6.5	飼育条件1	15
	6.6	飼料及び飲料水中の混入物質1	15
	6.7	動物の識別及びケージへの表示1	15
	6.8	投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由	15
	6.9	投与方法1	6
	6.10	投与量及びその設定根拠並びに群構成I	
	6.11	観察及び検査の方法1	
	6.11.	1 一般状態の観察	16

6.11.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定...... 17

	6.	11.2.1	詳細な一般状態の観察	17
	6.	11.2.2	機能検査	17
	6.	11.2.3	握力測定	17
	6.	11.2.4	自発運動量の測定	17
	6.11.	3 体重	測定	17
	6.11.	4 摂餌:	量測定	18
	6.11.	5 尿検:	查	18
	6.11.		学検査	
	6.11.	7 血液	化学検査	20
	6.11.		学検査	
	6.	11.8.1	剖検	
	6.	11.8.2	器官重量測定	
	6.	11.8.3	病理組織学検査	
	6.12	統計解析		22
7.	試験			
	7.1	一般状態		23
	7.2		般状態、機能検査、握力及び自発運動量	
	7.2.1		な一般状態	
	7.2.2	機能	岭 査	23
	7.2.3			
	7.2.4		運動量	
	7.3			
	7.4			
	7.5		摂水量含む)	
	7.6		查	
	7.7		検査	
	7.8	Total Control of the		
	7.9			
	7.10		学検査	
8.	考察			
9.				

义

 Fig. 1~4
 自発運動量

 Fig. 5
 体重

 Fig. 6
 摂餌量

表

Table 1-1~1-3 一般状態 Table 2-1-2-18 詳細な一般状態 Table 2-19, 2-20 機能検査 Table 2-21, 2-22 握力 Table 2-23, 2-24 自発運動量 Table 3-1, 3-2 体重 Table 4-1, 4-2 摂餌量 Table 5-1~5-8 尿検査 (摂水量含む) Table 6-1~6-6 血液学検査 Table 7-1~7-4 血液化学検査 Table 8-1~8-8 器官重量 Table 9-1, 9-2 剖検所見 Table 10-1~10-5 病理組織学検査

3. 試験実施概要

3.1 試験計画書

試験番号 : B-6586

試験表題: モルダントブラック-7のラットを用いた

2週間回復性観察を含む28日間反復経口投与毒性試験

3.2 試験目的

被験物質をラットに28日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、その後2週間の回復期間を設けて障害の可逆性を調べることを目的とした。

3.3 試験委託者

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室 〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.4 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター 〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

3.5 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

4. 要約

モルダントブラック-7 の 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crl:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹]を用いて実施した。投与量は 0 (注射用水:対照群)、40、200 及び 1000 mg/kg とし、対照群と 1000 mg/kg 投与群の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設けて、毒性変化の可逆性を検討した。

機能検査、握力及び血液学検査に、被験物質投与の影響は認められなかった。

一般状態では、投与期間中に軟便と着色尿が 200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で認められた。

詳細な一般状態の観察では、投与期間中にオープンフィールド内観察における排糞 数の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で認められた。

自発運動量では、投与4週に1000 mg/kg 投与群の雌で高値がみられた。

体重及び摂餌量では、投与期間の初期に低値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられた。 尿検査(摂水量を含む)では、投与 4 週にビリルビンの陽性例の増加傾向が 1000 mg/kg 投与群の雌で、摂水量の高値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与 群の雌で、尿量の低値と浸透圧の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄と 40 mg/kg 以上の投 与群の雌でみられた。

血液化学検査では、投与期間終了時にカリウムの高値が 200 mg/kg 以上の投与群の 雌でみられた。

病理学検査では、腎臓において絶対あるいは相対重量の高値が 1000 mg/kg 投与群の 雌雄で、組織学検査に尿細管上皮細胞の褐色色素が 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、 尿細管上皮細胞の好酸性小滴が 1000 mg/kg 投与群の雄で認められた。更に、盲腸及び 結腸の粘膜の過形成が 200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で、直腸の粘膜の過形成が 1000 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

上述した変化についてはいずれも休薬により、軽減あるいは消失し回復性を示した。

以上の結果、モルダントブラック-7の本試験条件下における無影響量は雄では病理 検査における大腸(盲腸と結腸)の粘膜の過形成などから 40 mg/kg/day と推定された。 一方、雌では尿検査における尿量の低値と浸透圧の高値から 40 mg/kg/day を下回ると 考えられた。

5. 緒言

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、モルダントブラック-7をラットに 28 日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、2 週間休薬し、障害の可逆性を調べたのでその成績を報告する。なお、本試験は株式会社ボゾリサーチセンター動物実験委員会の承認を受けている。また、遵守した基準及び準拠したガイドラインなどは以下の通りである。

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質は 提供された。本試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、分析チャートを添付資料 1 に示した。

名称: モルダントブラック-7

英名: Mordant Black -7

CAS 番号 : 3618-60-8 官報公示整理番号 : 5-2111 分子量 : 416.77

分子式 : C₁₆H₁₀CIN₂NaO₆S

構造式:

ロット番号:

純度 : 92.7%

不純物: 7.3 % (うち塩分として塩素イオン 7100 mg/kg、硫酸

イオン 1300 mg/kg が含有)

入手量: 700 g (100gを7本)

安定性: 投与終了後、提供先で安定性を確認した結果、安定で

あることが確認された(添付資料2)。

保存方法 : 冷暗所(実測値 3~8°C)、密閉、吸湿性あり、シリカ

ゲルと同梱

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物

質調製室

取扱い上の注意:マスク、手袋及び保護眼鏡を着用した。

火気や熱源などの着火源から遠ざけ、酸化剤との接触

を避けた。

返却 : 被験物質 1 g を保存試料として保存した。分析用に小

分けした被験物質の残量は廃棄した。また、被験物質 の残量は提供先に送付し安定性を確認後、すべて廃棄

した。

6.1.2 媒体

名称 : 注射用水

ロット番号 : 8K74

製造者: 株式会社大塚製薬工場

保存方法 : 室温

保存場所 : 御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室

なお、本試験に先立って実施した被験液中のモルダントブラック-7の安定性・均一性試験(試験番号: A-2175)において、注射用水中での被験物質の安定性及び均一性に良好な結果が得られていることから、媒体として注射用水を選択した。

6.2 投与液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に採取し、注射用水に懸濁して 8 mg/mL 液 (低用量群液)、40 mg/mL 液 (中用量群液)及び 200 mg/mL 液 (高用量群液)を調製した。被験液は7日に1回以上の頻度で調製し、調製後7日以内に使用した。

6.2.1 投与液の保存方法

投与液は1日必要分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、使用時まで冷所(冷蔵庫内、許容範囲 1~10°C、実測値 3~6°C)、遮光で保存した。

6.2.2 媒体中での安定性

本被験物質の 0.1 及び 200 mg/mL 懸濁液(媒体:注射用水)は、冷所(冷蔵庫内、1~10°C)、遮光で 8 日間、その後室温で 24 時間保存したとき、安定であることが株式会社ボゾリサーチセンターで確認されている(試験番号: A-2175、添付資料 3)。

6.2.3 被験液の濃度・均一性確認

投与1週と4週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度・均一性を株式会社ボゾリサーチセンターで HPLC 法を用いて確認した。その結果、表示値に対する濃度の割合は102.4~107.3 % (許容範囲:表示値に対する割合;100±10 %)、均一性は0.0~1.5 % (許容値:CV10 %以下)であり、いずれも許容範囲内であった(添付資料4-1 及び4-2)。分析法の概略を次に示す。

測定対象標準物質

名称: モルダントブラック-7

ロット番号 : 08001

保存方法 : 冷暗所 (実測値 2~8°C)、密閉、吸湿性あり、シリカ

ゲルと同梱

保存場所: 御殿場研究所 被験物質保存室及び生化学部標準物質

保存場所

HPLC 測定条件

カラム

: CHEMCOSORB 7-ODS-L

(4.6 mm I.D. × 150 mm、7 μm、株式会社ケムコ)

カラム恒温槽設定温度

45°C

HPLC 移動相

2.5 mmol/L りん酸テトラブチルアンモニウム溶液 (pH

3.0) /メタノール (30/70、v/v)

流速

1.2 mL/min

検出

UV (測定波長 300 nm)

オートサンプラー設定温度

4°C

注入量

10 µL

注入順序

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液(システム適合性用)
2	3	標準溶液 (定量用)
3	1	測定実測試料 (8 mg/mL-上層)
4	1	測定実測試料(40 mg/mL-上層)
5	1	測定実測試料 (200 mg/mL-上層)
6	1	測定実測試料 (8 mg/mL-中層)
7	1	測定実測試料 (40 mg/mL-中層)
8	1	測定実測試料 (200 mg/mL-中層)
9	1	測定実測試料 (8 mg/mL-下層)
10	1	測定実測試料 (40 mg/mL-下層)
11	1	測定実測試料 (200 mg/mL-下層)

標準溶液及び測定実測試料の測定は、注入後24時間以内に実施した。なお、バリデーション試験で、オートサンプラー内における24時間保存後の安定性が確認されている。また、測定しない測定試料がある場合には、これを除いた試料を表の順で注入した。

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験 に使用された系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択 した。

6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crl:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 47 匹^{注)} を 5 週齢で入手し、当所で 9 日間検疫・馴化飼育し、一般状態の観察(1 回/日)、体重測定(3 回)及び詳細な一般状態の観察(1 回)を行い、体重増加量、一般状態及び詳細な一般状態の観察に異常がみられず健康と思われる雌雄各 36 匹(主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹)を選び、6 週齢

で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 205~233 g、雌で 151~193 g であった。動物は検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日(投与開始の 2 日前)の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ(ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた)により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験系から除外し安楽死させた。

注): 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 45 匹であったが、実際には雌雄各 47 匹が納入された。

6.5 飼育条件

動物は温度 20~24°C (許容範囲: 23±3°C)、相対湿度 46~60% (許容範囲: 50±20%) 換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の動物飼育室 (301 号室) で、ブラケット式金属製網ケージ (W 250×D 350×H 200 mm: 日本ケージ株式会社) で個別飼育し、毎日 1 回以上飼育室内の清掃を実施した。固形飼料 CRF-1 (オリエン タル酵母工業株式会社、ロット番号: 090407、090512、090609) は給餌器を用いて、 また、御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用ロットについて Eurofins Scientific Analytics で分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社に水道法に準拠する水質検査を定期的に(年4回)依頼した。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入荷時に小動物用耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及び用量ごと(対照群、低、中及び高用量群の順)に4桁の番号をつけた。この場合、1000の位は群、100の位は性(0番を雄、1番を雌)、10と1の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量(群)ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するため、ケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

6.8 投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は 28 日間 とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 日 1 回 (7 回/週) とした。 回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる 2 週間 (14 日間) とし、こ

の間投与を行わなかった。

6.9 投与方法

投与容量は 5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した (08:01~12:13 の間)。対照群には媒体 (注射用水) を同様に投与した。個体ごとの投与液量 (表示単位:0.1 mL) は最新の体重を基準に算出した。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

モルダントブラック-7の0 (注射用水)、100、300及び1000 mg/kg/dayを1群雌雄各5匹のラットに14日間反復経口投与した結果¹⁾、主な変化として、雄は1000 mg/kg投与群の1例に死亡が、雌は1000 mg/kg投与群の器官重量に変化が認められた。従って、本試験における投与量は、1000 mg/kg投与群を高用量とし、公比5で除し、200 mg/kgを中用量に、40 mg/kgを低用量とし、対照群を加え4群構成とした。1群当たりの動物を主群では雌雄各6匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各6匹とした。群構成表を次の表1に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量	濃度	投与容量	性	主	群	E	復 群	
武八祖央 和干	(mg/kg)	(mg/mL)	(mL/kg)	111	動物数	動物番号	動物数	動物番号	
対照群	0	0	5	雄雌	6 6	1001~1006 1101~1106	6	1007~1012 1107~1112	
低用量群	40	8	5	雄雌	6 6	2001~2006 2101~2106	:	:	
中用量群	200	40	5	雄雌	6 6	3001~3006 3101~3106	:	:	
高用量群	1000	200	5	雄雌	6 6	4001~4006 4101~4106	6 6	4007~4012 4107~4112	

6.11 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記 の通りとした。

投与1日 (day 1 of administration) : 投与開始日

投与 1 週 (week 1 of administration) : 投与 1 から投与 7 日

回復1日(day l of recovery) : 回復開始日(投与期間終了の翌日)

回復1週 (week 1 of recovery) : 回復1から回復7日

6.11.1 一般状態の観察

全個体について投与期間中は毎日3回、投与前と投与直後及び約2時間後(ただし、休日と詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定を実施する時は投 与前と投与直後の2回)、回復期間中は毎日1回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及

び排泄物などの一般状態を観察した。

6.11.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は、全個体について、投与開始前に1回、投与期間中及び回復期間中は毎週1回実施した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は、投与4週(雄を投与26日、雌を投与27日)及び回復2週(回復13日)に行った。詳細な一般状態の観察及び機能検査については実測値あるいはスコア化した評点法を用いた。なお、観察及び検査は投与の情報を制限(ブラインド化)し、動物をランダムに配置した状態で行った。

6.11.2.1 詳細な一般状態の観察

1) ホームケージ内観察 姿勢、痙攣、異常行動

2) 手に持っての観察

ケージからの取り出しやすさ、被毛・皮膚の状態、眼・鼻の分泌物、眼球(眼球突出、眼瞼閉鎖状態)、可視粘膜、自律神経機能(流源、立毛、瞳孔径、流涎、異常呼吸)、ハンドリングに対する反応

3) オープンフィールド内観察

覚醒状態、痙攣、異常行動、常同行動、歩行、姿勢、身繕い、立ち上がり回数、排 泄物(排糞数、排尿)

6.11.2.2 機能検査

聴覚反応、接近反応、接触反応、痛覚反応、瞳孔反射、空中正向反射、着地開脚幅

6.11.2.3 握力測定

CPU ゲージ MODEL-9502A (アイコーエンジニアリング株式会社) を用いて前肢及び後肢の握力を測定した。

6.11.2.4 自発運動量の測定

実験動物用自発運動センサーNS-AS01 (株式会社ニューロサイエンス) を用いて自 発運動量を測定した。測定は1時間とし、10分間隔及び0~60分の測定値を集計した。

6.11.3 体重測定

全個体について、投与期間中は投与 1、4、7、10、14、17、21、24 及び 28 日の投与前に、回復期間中は回復 1、3、7、10 及び 14 日に測定した。測定は $08:43\sim10:44$ の間に行った。剖検日には相対器官重量算出のため、前日から約 16 時間絶食させた後の体重を測定した($08:00\sim08:18$)。

6.11.4 摂餌量測定

全個体について、投与期間中は投与1、7、14、21及び28日の投与前に、回復期間中は回復7及び14日に測定した。測定は09:02~10:56の間に行った。なお、投与開始日の測定は前日からの1日量を、投与7日は6日間の累積摂取量を、その後は7日ごとに7日間の累積摂取量を測定し、1匹1日量を算出した。回復1週は回復1日から7日までの6日間の累積摂取量を、その後は7日間の累積摂取量を測定し、1匹1日量を算出した。

6.11.5 尿検査

投与4週及び回復2週に行った。

投与 4 週(投与 22 日の投与後)は全個体について、回復 2 週(回復 11 日)は回復 群の全個体について、検査当日にそれぞれ採尿器をセットしたケージに収容し、絶食・ 自由摂水下で4時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取し、 表 2.に記載した項目及び方法により検査した。また、摂水量は、採尿ケージに収容し た状態で前日からの1日当たりの摂水量を、給水瓶を用いて測定した。

表 2. 尿検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 4時間尿についての検査	With LM
検査項目	測定方法
pH	オーションスティックス-7EA 試験紙 *) (アークレイ株式会社)
たん白質	オーションスティックス-7EA 試験紙 a) (アークレイ株式会社)
ケトン体	オーションスティックス-7EA 試験紙 a) (アークレイ株式会社)
グルコース	オーションスティックス-7EA 試験紙 *) (アークレイ株式会社)
潜血	オーションスティックス-7EA 試験紙 a) (アークレイ株式会社)
ビリルビン	オーションスティックス-7EA 試験紙 *) (アークレイ株式会社)
ウロビリノーゲン	オーションスティックス-7EA 試験紙 a) (アークレイ株式会社)
色調	内眼観察
	鏡検法
尿量 (4時間量) 在)	目盛付スピッツ管を用いた容量測定(単位:mL)
2) 20 時間尿についての検査	
検査項目	測定方法
尿量 (20 時間量) 在1	メスシリンダーを用いた容量測定 (単位:mL)
浸透圧	氷点降下法 b) (単位: mOsm/kg)
使用測定機器	
a): AUTIONTM MINI AM-429	90 (アークレイ株式会社)
b):自動浸透圧測定装置 オ	ートアンドスタット OM-6030 (アークレイ株式会社)

注): 4時間の尿量と20時間の尿量を合計して24時間の尿量(mL/24 h)を算出した。

6.11.6 血液学検査

投与期間及び回復期間終了の翌日の計画剖検時に、前日から一夜(16~20 時間)絶食させた全個体について、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から EDTA-2K 加採血瓶 (SB-41:シスメックス株式会社)に血液(約1 mL)を採取した。得られた血液について表 3.1)に記載した項目及び方法により検査した。更に、血液(0.9 mL)を 3.8%クエン酸ナトリウム溶液加試験管(血液 9 容に対し 1 容の割合)に採取し、遠心分離(3000 rpm、1580×g、10 分間)により得られた血漿について表 3.2)に記載した項目及び方法により検査した。なお、鏡検による確認に備え、全個体についてMay-Grünwald-Giemsa染色法による血液塗抹標本を作製したが、鏡検による確認は不要と判断し、鏡検は実施しなかった。

表 3. 血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) EDTA-2K 加血液についてのf	查	
検査項目	測定方法	単位
赤血球数 (RBC)	2角度レーザーフローサイトメトリー法*)	104/μL
ヘモグロビン量(HGB)	シアンメトヘモグロビン変法 a)	g/dL
ヘマトクリット値(HCT)	赤血球数及び平均赤血球容積から算出。	%
平均赤血球容積(MCV)	2角度レーザーフローサイトメトリー法*	fL
平均赤血球血色素量(MCH)	赤血球数及びヘモグロビン量から算出 a)	pg
平均赤血球血色素濃度(MCHC)	ヘモグロビン量及びヘマトクリット値から算出*)	g/dL
網赤血球率(Retic.)	RNA 染色によるレーザーフローサイトメトリー法 *)	%
血小板数 (PLT)	2角度レーザーフローサイトメトリー法*)	10⁴/μL
白血球数 (WBC)	2角度レーザーフローサイトメトリー法*)	$10^2/\mu L$
白血球百分率(註)	ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法	%
	+2 角度レーザーフローサイトメトリー法 *)	$10^{2}/\mu L$
2) クエン酸ナトリウム加血液か	ら分離した血漿についての検査	
検査項目	測定方法	単位
プロトロンビン時間 (PT)	クロット法り	S
活性化部分トロンボ		
プラスチン時間 (APTT)	クロット法 ^{b)}	s
フィブリノーゲン量(FIB)	トロンボプラスチン法 ⁶⁾	mg/dL
使用測定機器		
):総合血液学検査装置アドヴィ	7 120 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Illinois, USA)	
	100 (Instrumentation Laboratory)	

注): リンパ球 (LYMP)、好中球 (NEUT)、好酸球 (EOS)、好塩基球 (BASO)、単球 (MONO) 及び大型非染色球 (LUC)。また、白血球百分率と白血球数から各分画の実数を算出した。

6.11.7 血液化学検査

血液学検査用試料と同時に採取した血液(約 4 mL)を凝固促進剤入り試験管(ベノジェクト II-オートセップ:テルモ株式会社)に取り、遠心分離(3000 rpm、1580×g、10 分間)し、得られた血清について、表 4.1)に記載した項目及び方法により検査した。また、ヘパリン加試験管(血液 1 mL 当たり約 20 単位のヘパリン)に採取した血液(約 2 mL)を遠心分離(3000 rpm、1580×g、10 分間)し、得られた血漿について表 4.2)に記載した項目及び方法により検査した。

表 4. 血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 分離した血清についての	検査	
検査項目	測定方法	単位
ALP	Bessey-Lowry 法 *)	IU/L
総コレステロール (T-CHO)	CEH-COD-POD 法 *)	mg/dL
トリグリセライド (TG)	LPL-GK-GPO-POD 法 a)	mg/dL
リン脂質 (PL)	PLD-ChOD-POD 法 4)	mg/dL
総ビリルビン (T-BIL)	アゾビリルビン法 4)	mg/dL
グルコース (GLU)	グルコースデヒドロゲナーゼ法 a)	mg/dL
尿素窒素 (BUN)	Urease-LEDH 法 *)	mg/dL
クレアチニン (CRNN)	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-POD 法 a)	mg/dL
ナトリウム(Na)	イオン選択電極法*)	mmol/L
カリウム (K)	イオン選択電極法 *)	mmol/L
塩素 (CI)	イオン選択電極法・ウ	mmol/L
カルシウム (Ca)	OCPC 法 *)	mg/dL
無機リン (P)	モリブデン酸法 a)	mg/dL
総たん白質 (TP)	Biuret 法 a)	g/dL
アルプミン(ALB)	BCG 法 a)	g/dL
A/G比 (A/G)	総たん白質及びアルブミンから算出	
2) ヘパリン加血液から分離	した血漿についての検査	
検査項目	測定方法	単位
AST	UV-rate 法 ^{a)}	IU/L
ALT	UV-rate 法 a)	IU/L
LDH	UV-rate 法 a)	IU/L
y-GTP	L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法 *)	IU/L
	TBA-120FR 形(新社名:東芝メディカルシステムズ株式会	社、旧社名: 棋
式会社東芝)	A STATE OF THE STA	

6.11.8 病理学検査

6.11.8.1 剖検

すべての動物について、採血後腹大動脈切断により放血致死させ、体外表・頭部・ 胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録 した。

6.11.8.2 器官重量測定

すべての動物について、次に示す器官の重量(絶対重量)を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重100g当たりの相対重量を算出した。

なお、*印を付した両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価 した。

脳、副腎*、胸腺、脾臓、心臓、肝臓、腎臓*、精巣*、精巣上体*、卵巣*、子宮

6.11.8.3 病理組織学検査

すべての個体について次に示す器官・組織を採取し、リン酸緩衝 10 v/v%ホルマリン液で固定した。ただし、肺はリン酸緩衝 10 v/v%ホルマリン液を注入後、眼球及び視神経はリン酸緩衝液で調製した 3 v/v%グルタルアルデヒド・2.5 v/v%ホルマリン液で固定後、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、それぞれリン酸緩衝 10 v/v%ホルマリン液で保存し、パラフィン包埋した。その後、切片としてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、主群の対照群及び高用量群(肉眼的異常部位については全例)について鏡検した。*で示した両側性器官については両側を摘出したが、鏡検は左側のみ行った。なお、被験物質投与の影響が疑われた雌雄の腎臓、盲腸、結腸、直腸については低及び中用量群並びに回復群の全個体を鏡検した。また、上皮小体の標本が低用量群の雄 1 例で作製することができなかったが、高用量群において被験物質投与の影響が認められていないことから、試験成績に影響はなかった。

大脳、小脳、脊髄(胸部)、坐骨神経*、眼球*、下垂体、甲状腺*、上皮小体*、副腎*、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、心臓、気管、肺(気管支を含む)、胃、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓*、膀胱、精巣*、精巣上体*、前立腺、卵巣*、子宮、胸骨(骨髄を含む)、大腿骨(骨髄を含む)*、大腿部骨格筋*及び異常部位(膵リンパ節)

他に、視神経*(視神経は眼球と分離せず、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製まで実施した。)、ハーダー腺*、胸大動脈、舌、食道、顎下腺*、舌下腺*、膵臓、膣、精嚢、乳腺(鼠径部)*、皮膚(鼠径部)*、個体識別部位(耳介)及び喉頭を摘出して保存した。

6.12 統計解析

オープンフィールド内観察の定量的項目、機能検査における定量的項目、握力測定、自発運動量の測定、体重(体重増加量を含む)、摂餌量、摂水量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液化学検査及び器官重量データについて、対照群と各投与群との間で統計解析を行った。先ず、主群については Bartlett 検定により分散性の検定を行った(有意水準:両側 1%)。分散が等しい場合は Dunnett 法を用いて、非等分散の場合は Dunnett 型の mean rank test を用いて、対照群と各投与群との間で検定を行った(有意水準:両側 5 及び 1%)。なお、回復群については、F 検定により各群の分散の均一性の検定(有意水準:片側 5%)を行った。その結果、等分散性が認められた場合には対照群と被験物質投与群との平均値の差について Student の t 検定(有意水準:両側 5 及び 1%)を、等分散性が認められなかった場合には Aspin-Welch の t 検定(有意水準:両側 5 及び 1%)を行った 2-6)。

7. 試験結果

7.1 一般状態

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~10 に示した。

1) 投与期間

軟便が 200 及び 1000 mg/kg 投与群の雌雄で投与 2 日以降に認められた。また、着色 尿が 200 mg/kg 投与群の雄で投与 2~14 日と雌で投与 2~9 日に散見され、1000 mg/kg 投与群の雌雄全例で投与 2 日以降より投与期間を通じて認められた。

2) 回復期間

1000 mg/kg 投与群の回復 1 日に軟便が雌雄で散見された。また、着色尿が雌雄全例で認められた。

7.2 詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 11~70 に示した。

1) 投与期間

オープンフィールド内観察において排糞数の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与1及び2週に認められた。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 71~76 に示した。

1) 投与 4 週

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復2週

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 77~82 に示した。

1) 投与 4 週

雌雄とも各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復2週

雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 83~88 に示した。

1) 投与 4 週

有意な高値が 40 mg/kg 投与群の雄の測定開始後 0~10 分の測定値に、1000 mg/kg 投与群の雌に測定開始後 50~60 分の測定値にみられ、更に、測定開始後 0~60 分の合計値にも有意な高値が認められた。

2) 回復2週

有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌の測定開始後 0~10 分と 30~40 分の測定値に認められた。

7.3 体重

成績を Fig.5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 89~94 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 4、7及び 10 日に認められた。

2) 回復期間

1000 mg/kg 投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

7.4 摂餌量

成績を Fig.6、Table 4-1、4-2 及び Appendix 95~100 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 7 日に、有意な高値が 1000 mg/kg 投与 群の雄で投与 14 日に認められた。

2) 回復期間

雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群とほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

7.5 尿検査(摂水量含む)

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 101~118 に示した。

1) 投与 4 週

色調において淡紫色が 40 mg/kg 投与群の雌 1/6 例と 200 mg/kg 投与群の雌雄各全例で、紫色が 1000 mg/kg 投与群の雌雄各全例でみられた。また、ビリルビンの陽性例が 1000 mg/kg 投与群の雌 3/12 例でみられ、陽性例の増加傾向が認められた。また、摂水量の有意な高値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、尿量の有意な低値と浸透圧の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄と 40 mg/kg 以上の投与群の雌で認められた。

2) 回復2週

浸透圧の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 119~136 に示した。

1) 投与期間終了時

いずれの検査項目においても、雌雄とも各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復期間終了時

平均赤血球血色素濃度の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、白血球百分率の実数で好酸球数の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 137~148 に示した。

1) 投与期間終了時

カリウムの有意な高値が 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、無機リンの有意の低値が 40 mg/kg 投与群の雄で認められた。

2) 回復期間終了時

いずれの検査項目においても、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 149~172 に示した。

1) 投与期間終了時

腎臓 : 絶対及び相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群

の雄で、相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の

雌で認められた。

2) 回復期間終了時

いずれの器官においても、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群の間に有意差は認められなかった。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

下垂体 : のう胞が 40 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。

胃 : 腺胃の暗赤色巣が 200 mg/kg 投与群の雌 2 例で、前胃

の隆起巣が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。

腎臓 : 暗調化が 40 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 5 例、200 mg/kg

以上の投与群の雌雄各全例で認められた。

精巣 ・ 小型化が 40 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例で認めら

れた。

精巣上体 : 小型化が 40 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例で認めら

れた。

2) 回復期間終了時

肺: 暗赤色巣が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。

腎臓 : 暗調化が1000 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 5 例で認めら

れた。

胃 ・ 漿膜の隆起巣が対照群の雌 1 例で認められた。 膵リンパ節 ・ 結節が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-5 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が盲腸、直腸、結腸及び腎臓で認められた。

盲腸: 軽微あるいは軽度な粘膜の過形成が対照群の雌雄各 1

例、40 mg/kg 投与群の雌雄各 2 例、200 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌 4 例、1000 mg/kg 投与群の雌雄各全例にみられ、200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で発現頻度の

増加傾向が認められた。

結腸 : 軽微あるいは軽度な粘膜の過形成が 200 mg/kg 投与群

の雄1例と雌4例、1000 mg/kg投与群の雄全例と雌5

例に認められた。

直腸 : 軽微あるいは軽度な粘膜の過形成が 1000 mg/kg 投与

群の雄1例と雌4例に認められた。

腎臓 : 軽微あるいは軽度な尿細管上皮細胞の好酸性小滴が

1000 mg/kg 投与群の雄 3 例に、軽微な尿細管上皮細胞の褐色色素が 200 mg/kg 投与群の雌 1 例、1000 mg/kg

投与群の雌全例に認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも 偶発性の変化と判断した。

眼球 : 軽微な網膜異形成と結膜の石灰沈着の肉芽腫が 1000

mg/kg 投与群の雄 I 例に認められた。

下垂体 : 軽度な異所性頭蓋咽頭管組織が 40 mg/kg 投与群の雄 1

例に認められた。

甲状腺: 軽微な鰓後体のう胞が対照群の雌雄各 1 例、1000

mg/kg 投与群の雌2例に認められた。

心臓 : 軽微な限局性の心筋炎が対照群の雄1例、1000 mg/kg

投与群の雄2例に認められた。

肺 軽微な動脈壁の鉱質沈着が1000 mg/kg投与群の雄2例

に、軽微な肺胞マクロファージの集簇が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に、軽微な限局性肺炎が対照群の雄 1

例に認められた。

胃 : 軽微あるいは軽度の腺胃のびらんが 200 mg/kg 投与群

の雌 2 例で、軽度な扁平上皮の限局性過形成が 1000

mg/kg 投与群の雌1例で認められた。

盲腸 : 軽微な粘膜の細胞浸潤が対照群の雄 1 例、200 mg/kg

投与群の雌1例に認められた。

肝臓 : 軽微な微小肉芽腫が対照群の雌雄各 4 例、1000 mg/kg

投与群の雄4例と雌5例に認められた。

腎臓 : 軽微あるいは軽度な再生尿細管が対照群の雄 2 例と雌

1 例、40 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例、200 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例、1000 mg/kg 投与群の雄 5 例 と雌 1 例に、軽微な間質性の細胞浸潤が対照群の雌 1 例、40 mg/kg 投与群の雌 1 例、200 mg/kg 投与群の雄 1

例、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた。

精巣 : 軽度あるいは高度な精細管の萎縮が 40 及び 1000

mg/kg 投与群の各1例で認められた。

精巣上体 - 軽微な間質性の細胞浸潤が対照群の1例、1000 mg/kg

投与群の2例に、高度な精子数の減少が40 mg/kg 投与 群の1例に、軽微あるいは軽度な管腔の細胞残屑が40 mg/kg 投与群と1000 mg/kg 投与群の各1例に認められ

た。

前立腺 : 軽微な間質性の細胞浸潤が対照群の3例、1000 mg/kg

投与群の1例に認められた。

大腿部骨格筋 : 軽微な筋線維の変性/壊死が 1000 mg/kg 投与群の雌雄

各1例に認められた。

2) 回復期間終了時

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも 偶発性の変化と判断した。

肺 : 軽微な限局性肺炎と骨化生が 1000 mg/kg 投与群の雄 1

例で認められた。

胃 ・ 軽度なのう胞封入が対照群の雌1例で認められた。

盲腸 : 軽微な粘膜の細胞浸潤が対照群の雌雄各1例に認めら

れた。

腎臓 : 軽微な再生尿細管が対照群の雄 1 例と雌 2 例、1000

mg/kg 投与群の雄1例と雌2例に、軽微な尿細管の好

酸性小滴が対照群の雄1例に認められた。

膵リンパ節: 軽度なリンパ節炎が1000 mg/kg 投与群の雌1例で認め

られた。

8. 考察

モルダントブラック-7 の 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crl:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹] を用いて実施した。投与量は 0 (注射用水:対照群)、40、200 及び 1000 mg/kg とし、対照群と 1000 mg/kg 投与群の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設けて毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態では、投与期間中に軟便と着色尿が 200 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられた。なお、回復期間中については軟便と着色尿が回復 1 日にみられたが、その後異常は認められなかった。

詳細な一般状態の観察では、投与期間中にオープンフィールド内観察において排糞 数の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、他に異常は認められなかった。

機能検査と握力では、投与及び回復期間を通じて異常は認められなかった。

自発運動量では、投与 4 週に 1000 mg/kg 投与群の雌の測定開始後 50~60 分の測定値 と測定開始後 0~60 分の合計値に高値がみられ、中枢及び末梢神経系の病理学検査に 異常はみられていないものの、被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復 2 週にも 1000 mg/kg 投与群の雌で測定開始後 0~10 分と 30~40 分の測定値に高値がみられたが、投与期間中に比べて変化の程度は減少し、休薬による回復性が認められた。その他、投与 4 週に 40 mg/kg 投与群の雄で測定開始後 0~10 分の測定値に高値がみられたが、投与量との関連性が認められていないことから偶発性と判断した。

体重及び摂餌量では、投与期間中に低値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、投与期間初期のみの変化であった。

尿検査(摂水量を含む)では、投与 4 週にビリルビンの陽性例の増加傾向が 1000 mg/kg 投与群の雌で、摂水量の高値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、尿量の低値と浸透圧の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄と 40 mg/kg 以上の投与群の雌でみられた。これらの変化は休薬によりいずれも消失し、回復性が認められた。また、色調において淡紫色あるいは紫色が 40 mg/kg 以上の投与群の雌と 200 mg/kg 以上の投与群の雄にみられたが、本被験物質の色調(黒~紫色)を反映したものと考えられたことから、毒性学的意義はないと判断した。

血液学検査では、回復期間終了時に平均赤血球血色素濃度の低値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、ごく軽度であり、赤血球数など関連する項目には変化はないことから偶発性と判断した。また、白血球百分率の実数で好酸球数の低値が 1000 mg/kg 投与群の雌雄でみられたが、ごく軽度であり、白血球数及び他の白血球百分率には変化がないことから、偶発性と判断した。

血液化学検査では、投与期間終了時にカリウムの高値が 200 mg/kg 以上の投与群の 雌でみられ、被験物質投与による腎臓への影響が疑われた。この変化は休薬により消 失し、回復性が認められた。その他、投与期間終了時に無機リンの低値が 40 mg/kg 投

与群の雄でみられたが、ごく軽度であり、高用量群では同様な変化はみられていない ことから、偶発性と判断した。

病理学検査では、投与期間終了時に腎臓の絶対及び相対重量の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。また、組織学検査で腎臓の尿細管上皮細胞の好酸性小滴が 1000 mg/kg 投与群の雄で、尿細管上皮細胞の褐色色素が 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、また、盲腸の粘膜の過形成が 200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で発現頻度の増加傾向が、結腸の粘膜の過形成が 200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で、直腸の粘膜の過形成が 1000 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、いずれも被験物質投与の影響が疑われた。これらの変化はいずれも休薬により消失し、回復性が認められた。その他、投与あるいは回復期間終了時に剖検において腎臓の暗調化が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄にみられたが、本被験物質の色調から、被験物質の沈着が示唆されたが、毒性学的意義はないと判断した。更に、下垂体ののう胞、腺胃と肺の暗赤色巣、胃において前胃と漿膜の隆起巣、精巣及び精巣上体の小型化及び膵リンパ節の結節がみられたが、いずれの変化もその出現状況などから偶発性と判断した。

以上の結果、モルダントブラック-7の本試験条件下における無影響量は雄では病理 検査における大腸(盲腸と結腸)の粘膜の過形成などから 40 mg/kg/day と推定された。 一方、雌では尿検査における尿量の低値と浸透圧の高値から 40 mg/kg/day を下回ると 考えられた。なお、いずれの変化も休薬による回復性が認められた。

9. 文献

- 1) 芹澤英樹:モルダントブラック-7 のラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験(予備試験) (株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号: C-B454、2009年)
- Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods.8th ed. Ames: Iowa State University Press;1989.
- Dunnett CW. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control.J Am Stat Assoc 1955; 50:1096-121.
- 4) Dunnett CW. New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 1964; 20:482-91.
- 5) 佐久間昭(1977):薬効評価ー計画と解析ーI東京大学出版会,東京.
- 6) 佐久間昭(1981): 薬効評価ー計画と解析-II 東京大学出版会, 東京.

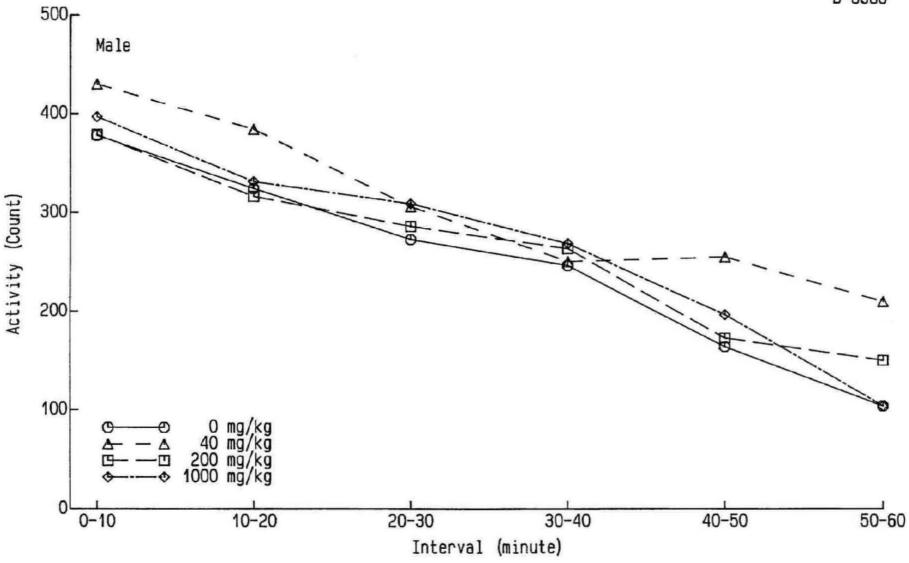


Fig.1 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

——— Motor activity (Week 4 of administration period) ———



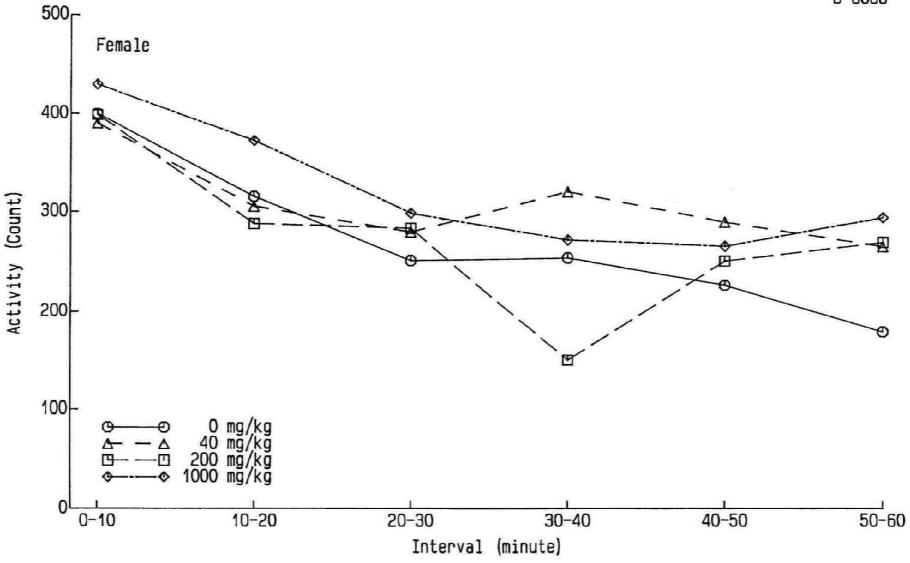


Fig.2 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

——— Motor activity (Week 4 of administration period) ———



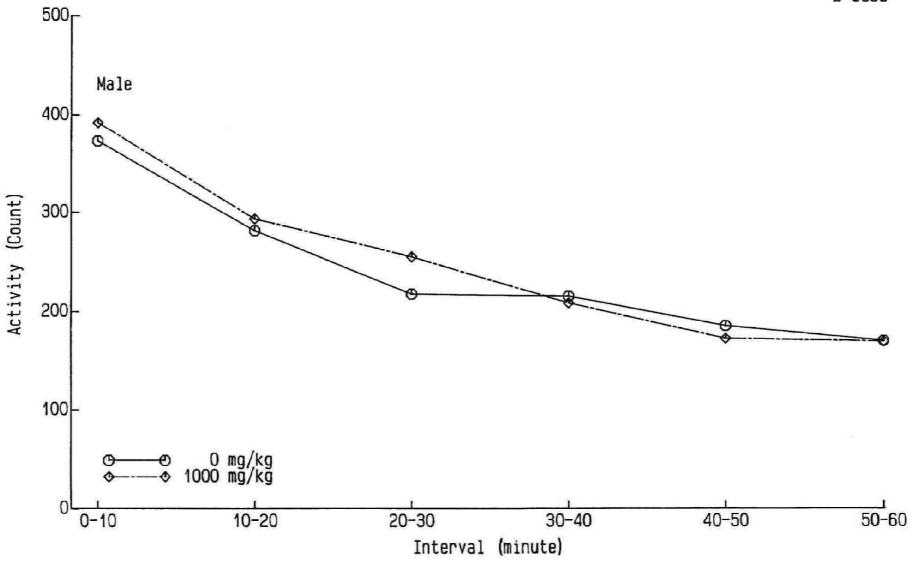


Fig.3 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

——— Motor activity (Week 2 of recovery period) ———

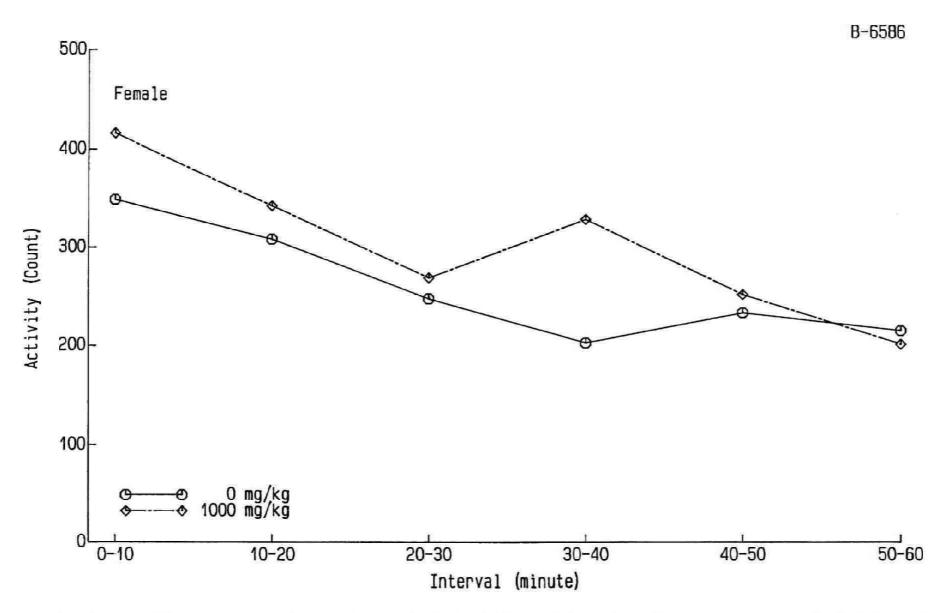
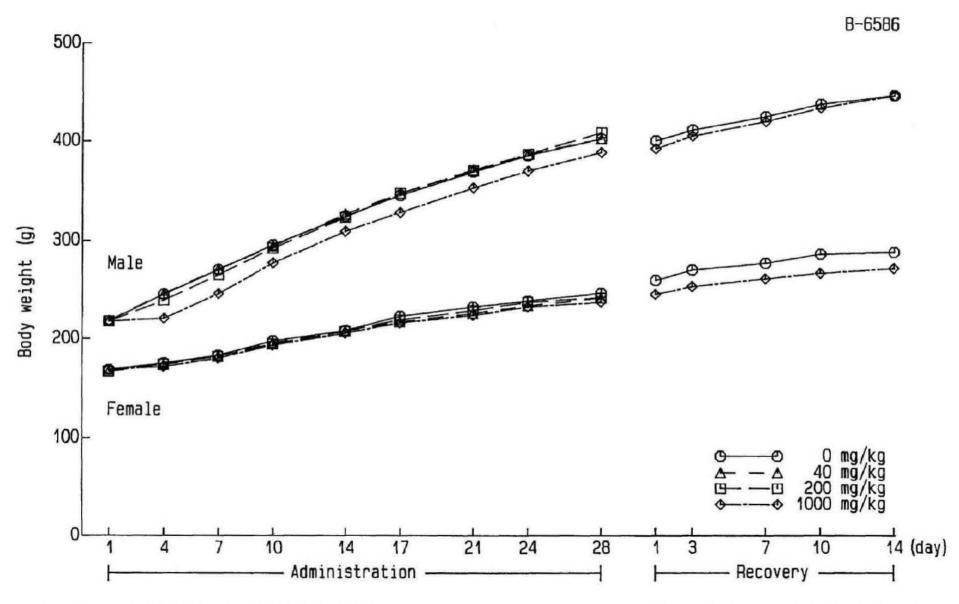


Fig.4 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

——— Motor activity (Week 2 of recovery period) ———



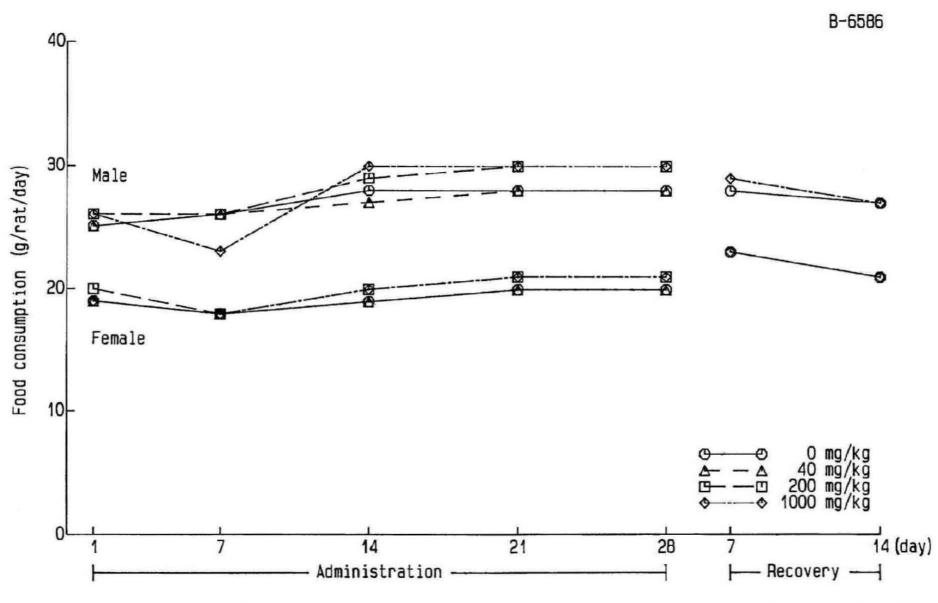


Fig.6 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

———— Food consumption ———

Table 1-1 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks
Clinical signs (Administration period)

Sex	Dose	Findings		Day of administration													
	mg/kg	1.11011069	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1
	0	No. of animals No abnormality	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	
ale	40	No. of animals No abnormality	6 6	6 6	6	6	6	6	6	6	6	6 6	6	6 6	6 6	6	
	200	No. of animals No abnormality Soft feces Colored urine	6 6 0	6 6 6	6 6 6	6 6 6	6 0 6 6	6 4 2 2	6 4 2 1	6 0 5 5	6 0 5 6	6 0 6 5	6 0 4 4	6 3 1 2	6 3 1 2	6 3 2 2	
¥)	1000	No. of animals No abnormality Soft feces Colored urine	12 12 0 0	12 0 12 12	12 0 12 12	12 0 12 12	12 0 12 12	12 0 9 12	12 0 5 12	12 0 6 12	12 0 7 12	12 0 5 12	12 0 2 12	12 0 0 12	12 0 1 12	12 0 1 12	
	0	No. of animals No abnormality	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	12 12	
emale	40	No. of animals No abnormality	6 6	6	6	6 6	6	6	6	6	6 6	6	6	6 6	6 6	6 6	
	200	No. of animals No abnormality Soft feces Colored urine	6 6 0	6 6 6	6 6 6	6 0 6 6	6 6 6	6 3 3 3	6 4 2 0	6 1 5 1	6 1 5 2	6 2 4 0	6 3 3 0	6 5 1 0	6 5 1 0	6 5 1 0	
	1000	No. of animals No abnormality Soft feces Colored urine	12 12 0 0	12 0 12 12	12 0 12 12	12 0 12 12	12 0 12 12	12 0 8 12	12 0 5 12	12 0 7 12	12 0 5 12	12 0 6 12	12 0 5 12	12 0 4 12	12 0 5 12	12 0 4 12	

Table 1-2 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Clinical signs (Administration period)

	D	Platters					3	Day o	f adm	inist	ratio	n					
Sex	Dose mg/kg	Findings	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29a)
	0	No. of animals No abnormality	12 12	6 6													
Male	40	No. of animals No abnormality	6 6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	200	No. of animals No abnormality Soft feces	6 4 2	6 4 2	6 4 2	6 4 2	6 5 1	6 6	6 3 3	6 5 1	6 5 1	6	6 5 1	6 6 0	6 5 1	6	6 2 4
	1000	No. of animals No abnormality Soft feces Colored urine	12 0 5 12	12 0 5 12	12 0 3 12	12 0 2 12	12 0 3 12	12 0 2 12	12 0 7 12	12 0 5 12	12 0 4 12	12 0 3 12	12 0 6 12	12 0 7 12	12 0 7 12	12 0 8 12	6 6
	0	No. of animals No abnormality	12 12	6													
Female	40	No. of animals No abnormality	6 6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	200	No. of animals No abnormality Soft feces	6 3 3	6 4 2	6 4 2	6 5 1	6 5 1	6 5 1	6 5 1	6 5 1	6 5 1	6 6 0	6 5 1	6 5 1	6 6 0	6 6 0	6 2 4
	1000	No. of animals No abnormality Soft feces Colored urine	12 0 5 12	12 0 4 12	12 0 3 12	12 0 4 12	12 0 4 12	12 0 3 12	12 0 6 12	12 0 4 12	12 0 4 12	12 0 4 12	12 0 8 12	12 0 8 12	12 0 7 12	12 0 7 12	6 6 6

a) : Day of necropsy

Table 1-3 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Clinical signs (Recovery period)

Grant Mariana		Day of recovery													
ex Dose mg/kg	Findings	1	2	3	4	5	6	7	8	8	10	11	12	13	14
ale 0	No. of animals No abnormality	6 6	6	6	6	6	6	6 6	6 6	6 6	6 6	6 6	6	6 6	6 6
1000	No. of animals No abnormality Soft feces Colored urine	6 0 3 6	6 0 0	6 0 0	6 6 0 0	6 6 0	6 0 0	6 6 0	6 6 0 0	6 0 0	6 6 0	6 6 0	6 0 0	6 0 0	6 6 0
emale 0	No. of animals No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6 6	6	6	6 6	6	6
1000	No. of animals No abnormality Soft feces Colored urine	6 0 5 6	6 6 0	6 0 0	6 6 0	6 0 0	6 6 0	6 6 0 0	6 6 0	6 6 0	6 6 0	6 6 0	6 6 0 0	6 6 0 0	6 6 0

Table 2-1 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: home cage observations (Week 1 of administration period)

Sex		Me	ile			Fer	nale		
Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000	
No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12	
	12	6	6	12	12	6	6	12	
	12	6	6	12	12	6	6	12	
	12	6	6	12	12	в	6	12	
	Dose (mg/kg)	Dose (mg/kg) 0 No. of animals 12 12	Dose (mg/kg) 0 40 No. of animals 12 6 12 6 12 6	Dose (mg/kg) 0 40 200 No. of animals 12 6 6 12 6 6 12 6 6	Dose (mg/kg) 0 40 200 1000 No. of animals 12 6 6 12 12 6 6 12 12 6 6 12	Dose (mg/kg) 0 40 200 1000 0 No. of animals 12 6 6 12 12 12 6 6 12 12 12 6 6 12 12 12 6 6 12 12	Dose (mg/kg) 0 40 200 1000 0 40 No. of animals 12 6 6 12 12 6 12 6 6 12 12 6 12 6 6 12 12 6	Dose (mg/kg) 0 40 200 1000 0 40 200 No. of animals 12 6 6 12 12 5 6 12 6 6 12 12 5 6 12 6 6 12 12 6 6	Dose (mg/kg) 0 40 200 1000 0 40 200 1000 No. of animals 12 6 6 12 12 6 6 12 12 6 6 12 12 6 6 12 12 6 6 12 12 6 6 12

Table 2-2 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: home cage observations (Week 2 of administration period)

	Sex		Me	ale			Fer	nale	
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture Normal		12	в	6	12	12	6	6	12
Convulsion None		12	6	6	12	12	6	6	12
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-3 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: home cage observations (Week 3 of administration period)

	Sex		Ma	ale			Fer	male	
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-4 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: home cage observations (Week 4 of administration period)

	Sex		Ma	ale			Fer	nale		
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000	
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12	
Posture Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Convulsion None		12	6	6	12	12	6	6	12	
Abnormal behavior None		12	6	6	12	12	6	6	12	

Table 2-5 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: home cage observations (Week 1 of recovery period)

	Sex	M	ale	Fer	male
	Dose (mg/kg)	0	1000	0	1000
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Posture Normal		6	6	6	6
Convulsion None		6	в	6	6
Abnormal behavior None		6	6	6	6

Table 2-6 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: home cage observations (Week 2 of recovery period)

	Sex	M	ale	Fer	nale	
	Dose (mg/kg)	0	1000	0	1000	
Parameter	No. of animals	6	6	6	6	200
Posture Normal		6	6	6	6	
Convulsion None		6	6	6	6	
Abnormal behavior None		6	6	6	6	

Table 2-7 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: in-the-hand observations (Week 1 of administration period)

	Sex		Ma	ale			Fer	nale	
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000
arameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
se of removal fro Easy	m cage	12	6	6	12	12	6	6	12
r condition Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
in Vormal		12	6	6	12	12	6	6	12
cretions-Eye, Nos Absent	e	12	6	6	12	12	6	6	12
ophthalmos Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
lpebral closure Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
cosal membranes Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
crimation Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
loerection Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
pil size Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
livation None		12	6	6	12	12	6	6	12
ormal respiratio	n	12	6	6	12	12	6	6	12
ectivity to handl Easy	ing	12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-8 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: in-the-hand observations (Week 2 of administration period)

	Sex		Ma	ile			Fer	nale		
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000	
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12	
Ease of removal f	rom cage	1 2	6	6	12	12	6	6	12	
Fur condition Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Skin Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Secretions-Eye, N Absent	lose	12	6	6	12	12	6	6	12	
Exophthalmos Absent		12	6	6	12	12	6	6	12	
Palpebral closure Normal	1	12	6	6	12	12	6	6	12	
Mucosal membranes Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Lacrimation Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Piloerection Absent		12	6	6	12	12	6	6	12	
Pupil size Normal		1 2	6	6	12	12	6	6	12	
Salivation None		12	6	6	12	12	6	6	12	
abnormal respirat Absent	ion	12	6	6	12	12	6	6	12	
Reactivity to ham Easy	ndling	12	6	6	12	12	6	6	12	

Table 2-9 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: in-the-hand observations (Week 3 of administration period)

	Sex		Ma	ale			Fer	nale	
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000
arameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
ase of removal Easy Some resistance	-TO 1969 3700 - 3	12 0	6	6	11 1	12 0	6	6	12 0
ur condition Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
kin Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
ecretions-Eye, Absent	Nose	12	6	6	12	12	6	6	12
xophthalmos Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
alpebral closus Normal	re	12	6	6	12	12	6	6	12
ucosal membrane Normal	ès	12	6	6	12	12	6	6	12
acrimation Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
iloerection Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
upil size Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
alivation None		12	6	6	12	12	6	6	12
normal respira	ation	12	6	6	12	12	6	6	12
activity to he Easy	andling	12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-10 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 4 of administration period)

	Sex		M	ile			Fei	nale	1997	
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000	
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12	
Ease of removal from	n cage	12	6	6	12	12	6	6	12	
Fur condition Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Skin Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Secretions-Eye, Nos Absent	9	12	6	6	12	12	6	6	12	
Exophthalmos Absent		12	6	6	12	12	6	6	12	
Palpebral closure Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
fucosal membranes Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
acrimation Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Piloerection Absent		12	6	6	12	12	6	6	12	
Pupil size Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Salivation None		12	6	6	12	12	6	6	12	
bnormal respiration	n.	12	6	6	12	12	6	6	12	
Reactivity to handl	ing	12	6	6	12	12	6	6	12	

Table 2-11 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: in-the-hand observations (Week 1 of recovery period)

	Sex	Ma	ale	Fer	nale
	Dose (mg/kg)	0	1000	0	1000
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal fr Easy	rom cage	6	6	6	6
Fur condition Normal		6	6	6	6
Skin Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, No Absent	ose	6	6	6	6
Exophthalmos Absent		6	6	6	6
Palpebral closure Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes Normal		6	6	6	6
Lacrimation Normal		6	6	6	6
Piloerection Absent		6	в	6	6
Pupil size Normal		6	6	6	6
Salivation None		6	6	6	6
Abnormal respirat: Absent	ion	6	6	6	6
Reactivity to hand Easy	dling	6	6	6	6

Table 2-12 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 2 of recovery period)

	Sex	M	ale	Fer	nale
	Dose (mg/kg)	0	1000	0	1000
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal from	n cage	6	6	6	6
Fur condition Normal		6	6	6	6
Skin Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nos Absent	9	в	6	6	6
Exophthalmos Absent		6	6	6	6
Palpebral closure Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes Normal		6	6	6	6
Lacrimation Normal		6	6	6	6
Piloerection Absent		6	6	6	6
Pupil size Normal		6	6	6	6
Salivation None		6	6	6	6
Abnormal respiration Absent	n	6	6	6	6
Reactivity to handl Easy	ing	6	6	6	6

Table 2-13 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of administration period)

	Sex		Ma	ıle			Fen	ale	
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000
arameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
rousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
bnormal behavior	,	December 1	INC.			0.0052	1560	280	7746
None		12	6	6	12	12	6	6	12
tereotypy						••			
None		12	6	6	12	12	6	6	12
ait Normal		12	•	^	12	12	6	•	12
		12	6	6	12	12	0	6	12
osture Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
			, O	•	12	12	· ·	•	
rooming None		12	6	6	12	12	6	6	12
	Superior Annual VIII								
earing count (Me	ean <u>+</u> 8.D.)	2 <u>+</u> 2	1 <u>*</u> 1	3 <u>+</u> 4	2 <u>+</u> 2	7 2	6 <u>+</u> 2	4 <u>+</u> 2	5 <u>+</u> 3
efecation count	(Mean+S.D.)	0 <u>+</u> 1	1 1	0 <u>+</u> 1	2+ 2+D	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0	0+ 0	0 _ 0
ination									
None		8 3	2	1	5	12	6	5	12
Small amount Moderate amount		3	2 4 0	1 3 2	5 2 5	12 0 0	6 0 0	0	12 0 0

ullet : p<0.05 (Significant difference from control group) D : Dunnett's test

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Table 2-14 Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of administration period)

	Sex		Ma	ile			Fer	male	
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
rousal Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion None		12	6	6	12	12	6	6	12
bnormal behavior None	•	12	6	6	12	12	6	6	12
tereotypy None		12	6	6	12	12	6	6	12
ait Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
sture Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
ooming None		12	6	6	12	12	6	6	12
aring count (Me	ean+S.D.)	3 <u>+</u> 2	1+ 2	3 <u>+</u> 2	2 <u>+</u> 3	6 <u>+</u> 3	5 <u>+</u> 1	6 <u>+</u> 3	5 <u>+</u> 3
fecation count	(Mean+S.D.)	0 <u>+</u> 1	1 _ 2	0 <u>+</u> 1	2+ 2 -DT	0 + 0	0 _ 0	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0
ination None Small amount Moderate amount		9 3 0	2 3 1	5 1 0	7 4 1	12 0 0	6 0 0	5 1 0	12 0 0

^{•• :} p<0.01 (Significant difference from control group)
DT : Dunnett-type rank test

Table 2-15

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: open field observation (Week 3 of administration period)

	Sex		Ma	le			Fem	ale		
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000	
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12	
Arousal			-				_			
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Convulsion										
None		12	6	6	12	12	6	6	12	
Abnormal behavi	or									
None		12	6	6	12	12	6	6	12	
Stereotypy										
None		12	6	6	12	12	6	6	12	
Gait										
No/minimal lo	cation	0	1	0	0	0	6	6	0	
Normal		0 12	5	6	12	12	6	6	12	
Posture										
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12	
Grooming										
None		12	6	6	12	12	6	6	12	
Rearing count (Mean+S.D.)	5 <u>+</u> 3	2 <u>*</u> 1	5 <u>+</u> 1	3 <u>+</u> 2	7 <u>+</u> 2	7 <u>+</u> 3	6 <u>+</u> 4	7 <u>+</u> 3	
Defecation coun	t (Mean+S.D.)	1 1	0 <u>+</u> 1	0 <u>+</u> 0	1 <u>+</u> 1	0 _ 0	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0	
Urination										
None		7	2	2	5	12	5	6	11	
Small amount		4	3	4	6	0	1	0	0	
Moderate amou	nt	1	1	0	1	U	U	U	U	

Table 2-16

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs: open field observation (Week 4 of administration period)

S	ex		Me	ale			Fer	nale	
r	ose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000
arameter N	fo. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
rousal Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
onvulsion None		12	6	6	12	12	6	6	12
bnormal behavior None		12	6	6	12	12	6	6	12
tereotypy None		12	6	6	12	12	6	6	12
ait Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
sture Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
ooming None		12	6	6	12	12	6	6	12
earing count (Mean+S.	D.)	3 <u>+</u> 3	2 <u>+</u> 2	3 <u>+</u> 2	2+ 2	8 <u>+</u> 3	7 <u>+</u> 2	6 <u>+</u> 5	8 + 2
efecation count (Mean	<u>+</u> S.D.)	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 1	1 <u>+</u> 2	1 <u>+</u> 1	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0	0+ 0
ination None Small amount		10	3	6	11	12 0	6	5 1	11 1

Table 2-17 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of recovery period)

	Sex	ME	11e	Fen	ale
	Dose (mg/kg)	0	1000	0	1000
Parameter	No. of animals	8	6	6	6
Arousal Normal		6	6	6	6
Convulsion None		6	6	6	6
Abnormal behavi None	lor	6	6	6	6
Stereotypy None		6	6	6	6
Gait Normal		6	6	6	6
Posture Normal		6	6	6	6
Grooming None		6	6	6	6
Rearing count ((Mean <u>+</u> S.D.)	5 <u>+</u> 3	3 <u>+</u> 1	7 <u>+</u> 2	6 <u>+</u> 2
Defecation coun	nt (Mean <u>+</u> S.D.)	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 1	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0
Urination None		6	6	6	6

Table 2-18 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of recovery period)

	Sex	Ma	ile	Fer	ale
	Dose (mg/kg)	0	1000	0	1000
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Arousal Normal		6	6	6	6
Convulsion None		6	6	6	6
Abnormal behavior	r	6	6	6	6
Stereotypy None		6	6	6	6
Gait Normal		6	6	6	6
Posture Normal		6	6	6	6
Grooming None		6	6	6	6
Rearing count (Me	ean <u>+</u> S.D.)	5 <u>*</u> 3	4 <u>+</u> 1	7 <u>+</u> 2	8 <u>+</u> 3
Defecation count	(Mean+S.D.)	1 _ 2	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0
Urination None Small amount Moderate amount	t	3 2 1	5 1 0	6 0 0	6 0 0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-19 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Manipulative test (Week 4 of administration period)

	Sex		M	ale			Fe	male	
	Dose (mg/kg)	0	40	200	1000	0	40	200	1000
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
uditory response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Approach response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Couch response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Cail pinch respons	se	12	6	6	12	12	6	6	12
Pupillary reflex Pass, both		12	6	6	12	12	6	6	12
erial righting re Total score: Mean		0 <u>+</u> 0							
anding foot splay	(mm: Mean+S.D.)	73 <u>+</u> 21	78 <u>+</u> 17	62 <u>+</u> 16	74 <u>+</u> 16	48 <u>+</u> 12	56 <u>+</u> 16	61 <u>+</u> 25	55 <u>+</u> 18

Table 2-20 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Manipulative test (Week 2 of recovery period)

	Sex	In.	ale	rei	male
	Dose (mg/kg)	0	1000	0	1000
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Auditory response Normal		6	6	6	6
NOT MAT		•	0		0
Approach response Normal		6	6	6	6
Touch response		6	6	6	6
Tail pinch response					
Normal		6	6	6	6
Pupillary reflex Pass, both		6	6	6	6
Aerial righting refl (Total score: Mean+S		0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0	0 <u>+</u> 0
Landing foot splay (
	mm. Maan.C D 1	81+11	79+18	67 <u>+</u> 17	72 <u>+</u> 12

Table 2-21 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Grip strength (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	F	fore limb	Hind limb	
	0	No.	12	12	
		Mean	1180	569	
		S.D.	181	64	
Male	40	No.	6	6 532	
		Mean	1055	532	
		S.D.	197	69	
	200	No.	6	6 521	
		Mean	1111	521	
		S.D.	169	110	
	1000	No.	12	12	
		Mean	1175	549	
		S.D.	193	102	
	0	No.	12	12	
	v	Mean	901	402	
		S.D.	101	47	
Female	40	No.	6	6	
		Mean	921 72	6 401 42	
		S.D.			
	200	No.	6	6 363 73	
		Mean	942 132	363	
		S.D.	132	73	
	1000	No.	12	12	
		Mean S.D.	880 101	375 51	
		S.D.	101	51	

Table 2-22 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Grip strength (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb	Hind limb g	
Male	0	No.	6	6	
		Mean	1508	889 107	
		S.D.	100	107	
	1000	No.	6	6	
		Mean	1578	915	
		S.D.	1578 203	6 915 93	
emale	0	No.	6	6	
CMOTE	U	Mean	1203	602	
		S.D.	1203 155	602 77	
	1000	No.	6	6	
		Mean	1232	6 646	
		S.D.	119	124	

No significant difference between treated group and control group.

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Table 2-23 Motor activity (Week 4 of administration period)

0	Dose				Inte	rval (min	utes)		
Sex	mg/kg	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	Total(0-60)
	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean S.D.	378 33	325 62	274 104	248 117	165 117	105 123	1495 386
Male	40	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean S.D.	430 • 32D	385 77	307 91	252 81	257 111	212 98	1843 317
	200	No.	6	6	6	6 265	6	6	6
		Mean S.D.	379 38	317 50	287 25	265 53	174 104	151 123	1572 254
	1000	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean S.D.	397 39	332 43	310 55	270 102	198 110	105 123	1611 329
	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
	· ·	Mean S.D.	400 44	316 66	253 69	256 96	229 74	181 104	1635 266
Female	40	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean S.D.	390 52	306 90	281 76	322 42	292 45	268 103	1859 364
	200	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean S.D.	399 58	289 38	285 78	151 102	253 51	272 68	1647 238
	1000	No.	12	12	12	12	12	12	12
	1500	Mean S.D.	430 51	373 54	300	274 132	268 64	297** 43D	

Unit : Count
• : p<0.05 ; •• : p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test</pre>

Table 2-24 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Motor activity (Week 2 of recovery period)

	Door				Inte	rval (min	ites)			
Sex	Dose mg/kg		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	Total(0-60)	
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean S.D.	6 373 55	6 282 77	219 96	217 119	187 101	172 113	1449 458	
	1000	No. Mean	6 392 49	6	6 256 65	6 210	6 174	6 171	6	
		S.D.	49	294 79	65	105	124	125	1496 307	
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean S.D.	349 32	309 34	6 249 65	204 63	6 235 119	217 102	1562 300	
	1000	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean S.D.	416• 46T	343 42	270 76	330 • • 33T	254 82	203 149	1815 291	

Unit : Count
• : p<0.05 ; •• : p<0.01 (Significant difference from control group)
T : Student's t-test</pre>

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Table 3-1 Body weight (Administration period)

C	Dose					Day of	administr	ation				C	
Sex	mg/kg		1	4	7	10	14	17	21	24	28	Gain 1-28	
	0	No. Mean S.D.	218 7	246 9	2 ¹² 271	296 16	325 19	12 346 20	370 22	387 26	12 404 26	12 186 25	
Male	40	No. Mean S.D.	219 6	247 7	272 10	295 15	327 21	348 25	372 33	388 36	404 42	185 42	
	200	No. Mean S.D.	218 8	240 8	266 11	293 14	324 17	348 17	371 20	388 22	410 26	192 24	
	1000	No. Mean S.D.	218 9	221 · · · 13D	12 247•• 16D	278* 19D	310 24	$^{12}_{329}_{29}$	354 29	371 30	390 34	172 172 29	
	0	No. Mean S.D.	12 168 6	175 6	12 183 9	198 8	209 9	12 224 12	12 234 14	12 240 15	248 13	12 79 13	
Female	40	No. Mean S.D.	166 8	173 9	182 13	196 12	208 12	218 14	227 14	235 13	243 13	78 7	
	200	No. Mean S.D.	166 9	174 7	182 10	195 12	208 12	220 12	230	239 9	243	7 ⁶ 6	
	1000	No. Mean S.D.	168 12	171 13	180 11	194 16	206 15	217 16	225 18	234 16	239 17	12 72 12	

Unit : g
• : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test</pre>

Table 3-2 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Body weight (Recovery period)

O	D			Day	of recove	ry		0-4-	
Sex	Dose mg/kg	V.	1	3	7	10	14	Gain 1-14	
Male	0	No. Mean S.D.	402 20	413 18	427 19	440 17	6 449 18	6 47 12	
	1000	No. Mean S.D.	394 49	6 407 53	422 56	436 59	6 449 59	55 14	
Femal	e 0	No. Mean S.D.	261 12	272 13	279 11	288 16	6 290 15	29 7	
	1000	No. Mean S.D.	247 23	255 24	263 27	269 23	274 28	27 6	

Unit : g
No significant difference between treated group and control group.

Table 4-1 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Food consumption (Administration period)

Cor	Dose			Day of a	dministra	tion	
Sex	mg/kg		1	7	14	21	28
	0	No. Mean S.D.	12 25 2	12 26 2	12 28 3	12 28 2	12 28 3
Male	40	No. Mean S.D.	25 1	26 2	26 27 3	28 3	28 4
	200	No. Mean S.D.	26 1	26 1	29 29	30 2	30 2
	1000	No. Mean S.D.	12 26 2	12 23 2D	12 30• 3D	12 30 4	12 30 3
	0	No. Mean S.D.	12 19 2	12 18 1	12 19 1	12 20 2	12 20 2
Female	40	No. Mean S.D.	19 2	18 2	19 2	$\begin{smallmatrix} 6 \\ 20 \\ 2 \end{smallmatrix}$	20 2
	200	No. Mean S.D.	20 2	18 1	20 1	21 1	21 1
	1000	No. Mean S.D.	12 19 3	12 18 2	12 20 2	12 21 2	12 21 2

Unit : g/rat/day
• : p<0.05 ; •• : p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test</pre>

Table 4-2 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Food consumption (Recovery period)

_			Day of re	very
Sex	Dose mg/kg		7	14
Male	0	No. Mean S.D.	28 2	2 ⁶ 2 ⁷
	1000	No. Mean S.D.	29 2	2 ⁶ 7
Female	0	No. Mean S.D.	6 23 2	6 21 1
	1000	No. Mean S.D.	23 3	21 3

Unit : g/rat/day No significant difference between treated group and control group.

Table 5-1 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 4 of administration period)

							pН							Pro	tei	n.)			Ke	eton	e t	2) ody				Glud	3 cos		
Sex	Dose mg/kg	No.	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	****	-	+-	+	++	+++	****	-	+-		**	+++	••••
	0	12	0	0	0	0	0	0	1	10	1	2	9	1	0	0	0	3	6	3	0	0	0	12	0	0	0	0	0
Male	40	6	0	0	0	0	0	0	0	5	1	3	1	2	0	0	0	2	2	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	200	6	1	0	0	0	0	0	0	5	0	3	3	0	0	0	0	3	2	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	1000	12	2	0	1	4	2	0	2	1	0	12	0	0	0	0	0	8	3	1	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	0	12	4	0	0	0	3	0	2	3	0	11	1	0	0	0	0	8	4	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
emale	40	6	1	0	0	1	0	0	3	1	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	200	6	1	0	1	1	1	1	0	1	0	4	2	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	1000	12	4	1	2	1	2	1	1	0	0	10	2	0	0	0	0	10	2	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
2) -	: <10 mg : <5 mg/ : <30 mg	dL	+-	: 1	5 -	25 m 7.5 m	ng/dl		+	7.	6 - 8	mg/dL 0 mg/d 5 mg/d	L	++	. :	31 -	- 250 mg - 70 mg	/dL		+++	:	71	- 125	mg/dL mg/dL mg/dL	+	+++	:	>600 >125 >750	mg/

Table 5-2 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose	No.	00	cul	t t	100	od		Bil	iru	5) bin		U	rot	oili	noge	3) en		(01	7) or		
	mg/kg	NO.	-	+-	+	++	+++	-	٠	**	***	****	+-	+	++	+++	++++	LY	3	Z D	Y I	P	P
	0	12	11	1	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	2	0	0	0
Male	40	6	5	0	1	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	•	3	0	0	0
	200	6	5	0	0	1	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	()	0	6	0
	1000	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	()	0	0	12
	0	12	10	1	0	1	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	2	0	0	0
Female	40	6	5	0	1	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	5	0	1	0
	200	6	5	0	0	1	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	()	0	6	0
	1000	12	10	1	0	1	0	9	3	0	0	0	12	0	0	0	0	0	()	0	0	12

^{+-: 0.03 - 0.05} mg/dL +: 0.06 - 0.15 mg/dL ++: 0.16 - 0.75 mg/dL +++: >0.75 mg/dL 4) - : <0.03 mg/dL

^{+: 0.5 - 1.5} mg/dL ++: 1.6 - 5.0 mg/dL +++: 5.1 - 10.0 mg/dL ++++: >10.0 mg/dL +: 2.0 - 3.5 mg/dL ++: 3.6 - 7.0 mg/dL +++: 7.1 - 12.0 mg/dL ++++: >12.0 mg/dL Y: Yellow DY: Dark yellow LP: Light purple P: Purple 5) - : <0.5 mg/dL 6) +- : <2.0 mg/dL

⁷⁾ LY : Light yellow

Table 5-3 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Urinalysis (Week 4 of administration period)

																	UR	INE	SED	IME	NT														
																												C	RYS	TALL	IZAT	ION	1		
Sex	Dose	No.			RBC					WBC					SEC	;			S	REC	!		C	ast				PS					CO		
	mg/kg	NO.	-	+	+	++	***	-	+-	+	++	***	-	+-	+	••	***	-	+-	٠	**	***	-	+-	•	_	+-	•	++	***	-	+-	+	++	+++
	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Male	40	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	200	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	1000	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	9	3	0	0	0	12	0	0	0	0
	c	12	11	1	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	11	1	0	0	0	12	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0
emale	40	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	200	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	1000	12	11	1	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	11	1	0	0	0	12	0	0	0	0

SEC : Squamous Epithelial Cell SREC : Small Round Epithelial Cell PS : Phosphate Salts CO : Calcium Oxalate

- : Negative -- : Slight -- : Mild -- : Moderate --- : Severe

Table 5-4 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Water intake and urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality nOsm/kg		
				The state of the s	***			
	0	12	Mean	35	10.6	1943		
			S.D.	5	2.9	222		
Male	40	6	Mean	39	9.0	2024		
			S.D.	6	3.0	462		
	200	6	Mean	51	8.0	2208		
			S.D.	4D	1.8	262		
	1000	12	Mean	57	6.3**	2547**		
			S.D.	9D	2.7D			
	0	12	Mean	34	9.1	1732	,	
			S.D.	34 9	9.1 3.2	356		
Female	40	6	Mean	31	5.200	2448•		
			S.D.	31	2.2D	678D		
	200	6	Mean	36 6	4.4.	2541•		
			S.D.	6	1.6D	410D		
	1000	12	Mean	43•	4.0	2453**		
			S.D.	7D	2.0D	694D		

^{• :} p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 5-5 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 2 of recovery period)

	I Marie Service						pН							Pro	1 tei				Ke	etor	ie i	2) body				Glu	3 cos		
Sex	Dose mg/kg	No.	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	100	+-	٠	++	+++	****		+-	+	++	+++	++++	III st e	+-	+ -	++ -	***	****
Male	0	6	1	0	0	0	0	0	1	3	1	3	2	1	0	0	0	3	1	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	1000	6	1	0	0	0	0	0	0	4	1	5	1	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Female	0	6	2	0	0	1	0	0	2	1	0	6	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	1000	6	3	0	0	0	1	0	0	2	0	6	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	: <10 mg						ng/dL				- 85 m - 30						250 mg/		_				- 600 m						mg/c

Table 5-6 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Urinalysis (Week 2 of recovery period)

Car	Dose	No.	00	cul	t b	100		- 3	Bil	iru	5) ıbin		U	rol	511 :	inog	6) ren		Co	7			
Sex	ng/kg	RU.	•	+-	+	++	***	186	+	++	+++	****	*-	٠	++	+++	++++	LY	Y	DY	LP	P	The second secon
Male	0	6	4	1	1	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	
	1000	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	
Female	0	6	4	0	0	2	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	
	1000	6	4	0	0	2	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	

^{+-: 0.03 - 0.05} mg/dL +: 0.06 - 0.15 mg/dL ++: 0.16 - 0.75 mg/dL +++: >0.75 mg/dL +: 0.5 - 1.5 mg/dL ++: 1.6 - 5.0 mg/dL +++: 5.1 - 10.0 mg/dL ++++: >10.0 mg/dL +: 2.0 - 3.5 mg/dL ++: 3.6 - 7.0 mg/dL +++: 7.1 - 12.0 mg/dL ++++: >12.0 mg/dL Y: Yellow DY: Dark yellow LP: Light purple P: Purple 4) - : <0.03 mg/dL

^{5) -: &}lt;0.5 mg/dL 6) +- : <2.0 mg/dL

⁷⁾ LY : Light yellow

Table 5-7 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Urinalysis (Week 2 of recovery period)

			_														UR	INE	SED	IME	ENT														
				69																								C	RYS	TALL	IZAT	ION	1		
Sex	Dose	No.			RBC					WBC					SEC	;			S	REC	;		C	ast				PS		he content			СО		
	mg/kg	NO.	-	+-	+	++	+++	-	+-	٠	++	***	-	+-	٠	**	***	-	+-	.*	**	***	-	+-	•	Ξ	+-	*	++	+++	-	+-	+	++	+++
Male	0	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	1000	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Female	0	6	5	1	0	o	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	1000	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	8	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0

SEC : Squamous Epithelial Cell SREC : Small Round Epithelial Cell PS : Phosphate Salts CO : Calcium Oxalate

- : Negative +- : Slight

+ : Mild

++ : Moderate +++ : Severe

Table 5-8 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Water intake and urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg	
Male	0	6	Mean S.D.	35 3	10.5 1.8	2106 210	
	1000	6	Mean S.D.	37 6	10.4 5.1	1805 466	
Female	o	6	Mean S.D.	37 9	9.0 3.3	1743 292	
	1000	6	Mean S.D.	33 8	6.5	2318• 395T	

^{• :} p<0.05 (Significant difference from control group)
T : Student's t-test

Table 6-1 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (After administration period)

Sex	Dose	No.		RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	Retic	PLT	PT	APTT	FIB	
JCA	mg/kg	110.		X104/#L	g/dL	4	fL	pg	g/dL	*	X10°/#L	S	S	mg/dL	
	0	6	Mean S.D.	852 47	16.0	45.0 2.2	52.8 1.1	18.7 0.4	35.5 0.3	2.3	123.1 12.5	14.1 1.7	21.4 3.1	291 24	
Male	40	6	Mean S.D.	826 42	15.6	44.5 1.4	53.9 2.0	18.9 0.7	35.1 0.2	2.6	115.5 9.7	15.8 4.1	22.9 2.6	293 17	
	200	6	Mean S.D.	814 35	15.5 0.5	43.7 1.6	53.7 1.6	19.0 0.5	35.4 0.5	2.5 0.4	114.9 16.1	14.4 1.4	23.3 3.9	289 20	
	1000	6	Mean S.D.	828 24	15.2 0.4	43.2 1.3	52.2 1.2	18.4 0.4	35.3	2.6 0.5	115.4 11.6	13.1 1.3	20.2	300 36	
	0	6	Mean S.D.	798 22	14.9 0.5	41.5 1.3	52.0 1.3	18.7 0.4	36.1 0.2	2.2 0.4	128.9 7.2	12.2 0.6	17.5 1.0	245 16	
emale	40	6	Mean S.D.	821 22	15.4 0.4	42.7 1.0	52.0 1.4	18.7 0.5	36.0	1.9 0.5	128.7 11.8	12.2 0.3	17.8 1.5	231 24	
	200	6	Mean S.D.	820 25	15.6 0.6	43.4 1.8	53.0 1.1	19.1 0.4	36.0 0.4	2.4 0:5	125.2 10.8	12.5 0.5	17.3 1.4	235 20	
	1000	6	Mean S.D.	834 48	15.2 0.6	42.2	50.7 2.3	18.2 0.9	35.9 0.6	2.6	141.7 10.7	12.3	18.7 2.0	235 17	

Table 6-2 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Hematology (After administration period)

Sex	Dose	No.		WBC	1	Differenti	al leuko	cyte coun	ts (%)		
	mg/kg	NO.		X102/µL	LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC	46.000
	0	6	Mean S.D.	113.9 43.6	78.0 7.8	18.2 7.9	0.9	0.3	1.7	1.0	
Male	40	6	Mean S.D.	101.4 43.8	76.1 5.8	20.2	0.8	0.3	2.0	0.6	
	200	6	Mean S.D.	84.9 12.6	75.5 8.1	20.7	1.1	0.2	1.9	0.6	
	1000	6	Mean S.D.	85.2 22.9	77.1 3.1	19.3 2.6	0.6	0.3	1.8	0.9	
	0	6	Mean S.D.	62.3 15.1	76.1 3.3	19.7 2.7	1.3	0.2 0.1	1.9	0.9 0.2	
Female	40	6	Mean S.D.	70.2 10.5	79.1 6.4	16.9 6.7	1.0	0.3	1.8	0.9	
	200	6	Mean S.D.	65.9 18.2	72.6 3.8	23.8	1.3	0.3	1.3	0.7	
	1000	6	Mean S.D.	70.0 24.2	71.9 11.7	24.6 11.3	0.5	0.2	1.5	0.8	

LUC : Large unstained cells
No significant difference in any treated groups from control group.

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Table 6-3 Hematology (After administration period)

Sex	Dose	No.		Dif	ferential	leukocyte	counts	(X10³/µL)		
	mg/kg	NO.		LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC	
	0	6	Mean S.D.	91.3 42.1	18.3	0.9	0.4	1.8	1.2	
			J.D.					0.4	1.0	
Male	40	6	Mean	78.1	19.7	0.8	0.4	1.9	0.8	
			S.D.	36.9	7.3	0.4	0.2	0.6	0.4	
	200	6	Mean	64.9	16.8	0.9	0.2	1.6	0.5	
			S.D.	15.6	3.3	0.3	0.0	0.3	0.1	
	1000	6	Mean	65.6	16.6	0.5	0.3	1.6	0.8	
			S.D.	17.3	5.6	0.3	0.3	0.5	0.4	
	0	6	Mean	47.5	12.2	0.8	0.1	1.1	0.6	
		7	S.D.	12.1	3.3	0.3	0.1	0.4	0.2	
Female	40	6	Mean	56.1	11.4	0.7	0.2	1.2	0.7	
		•	S.D.	12.4	2.9	0.2	0.1	0.5	0.4	
	200	6	Mean	48.0	15.7	0.8	0.2	0.9	0.5	
	F. F. F.	-	S.D.	13.9	4.6	0.4	0.1	0.3	0.2	
	1000	6	Mean	51.6	16.1	0.7	0.2	0.9	0.6	
			S.D.	25.2	7.3	0.7	0.1	0.1	0.3	

LUC : Large unstained cells No significant difference in any treated groups from control group.

Table 6-4 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Hematology (After recovery period)

Doce	No		RBC	HGB	HCT	MCV	мсн	MCHC	Retic	PLT	PT	APTT	FIB	
mg/kg	NO.		X104/#L	g/dL	*	fL	pg	g/dL	*	X10°/µL	S	s	mg/dL	
0	6	Mean S.D.	883 26	16.3 0.4	46.3 1.1	52.5 1.6	18.4 0.5	35.1 0.3	2.3	.4 9.1 1.5 .8 114.6 16.		24.0 2.0	311 30	
1000	6	Mean S.D.	875 43	15.8	45.7 1.4	52.3 1.1	18.1 0.5	34.6* 0.4T	2.8 0.5		16.1 1.9	23.2 3.1	308 19	
0	6	Mean S.D.	803 29	14.6 0.4	41.0 1.3	51.1 1.0	18.2 0.5	35.6 0.3	2.4 0.4	124.8 15.1	11.8 0.1	18.6 2.6	262 21	
1000	6	Mean S.D.	818 43	14.7 0.5	41.6 1.3	50.9 1.6	18.0 0.6	35.4 0.4	2.5 0.2	136.2 14.8	11.9 0.7	20.3 3.1	236 37	
	0 1000	0 6 1000 6	0 6 Mean S.D. 1000 6 Mean S.D. 0 6 Mean S.D.	Dose No. mg/kg X104/µL 0 6 Mean 883 S.D. 26 1000 6 Mean 875 S.D. 43 0 6 Mean 803 S.D. 29 1000 6 Mean 818	Dose No. mg/kg X104/µL g/dL 0 6 Mean 883 16.3 S.D. 26 0.4 1000 6 Mean 875 15.8 S.D. 43 0.5 0 6 Mean 803 14.6 S.D. 29 0.4 1000 6 Mean 818 14.7	Dose No. mg/kg X104/#L g/dL % 0 6 Mean 883 16.3 46.3 5.D. 26 0.4 1.1 1000 6 Mean 875 15.8 45.7 5.D. 43 0.5 1.4 0 6 Mean 803 14.6 41.0 5.D. 29 0.4 1.3	Dose No. mg/kg X104/µL g/dL % fL 0 6 Mean 883 16.3 46.3 52.5 S.D. 26 0.4 1.1 1.6 1000 6 Mean 875 15.8 45.7 52.3 S.D. 43 0.5 1.4 1.1 0 6 Mean 803 14.6 41.0 51.1 S.D. 29 0.4 1.3 1.0 1000 6 Mean 818 14.7 41.6 50.9	Dose mg/kg No. mg/kg ×10 ⁴ /μL g/dL % fL pg 0 6 Mean S.D. 26 0.4 1.1 1.6 0.5 1000 6 Mean S75 S.D. 15.8 S.D. 45.7 S.D. 52.3 S.D. 18.1 S.D. 0 6 Mean S.D. 803 S.D. 14.6 S.D. 41.0 S.D. 51.1 S.D. 18.2 S.D. 1000 6 Mean S.D. 29 S.D. 0.4 S.D. 1.3 S.D. 1.0 S.D. 1000 6 Mean SIS S.D. 14.7 S.D. 41.6 SO.9 SO.9 SO.9 18.0 SO.9 SO.9	Dose mg/kg No. mg/kg ×10 ⁴ /μL g/dL % fL pg g/dL 0 6 Mean S.D. 26 0.4 1.1 1.6 0.5 0.3 1000 6 Mean S.D. 875 15.8 45.7 52.3 18.1 34.6* S.D. 43 0.5 1.4 1.1 0.5 0.4T 0 6 Mean S.D. 29 0.4 1.3 1.0 0.5 0.3 1000 6 Mean S18 14.7 41.6 50.9 18.0 35.4	Dose mg/kg No. x10 ⁴ /µL g/dL % fL pg g/dL % 0 6 Mean S.D. 26 0.4 1.1 1.6 0.5 0.3 0.4 1000 6 Mean S75 S.D. 15.8 S.D. 45.7 S.D. 52.3 S.D. 18.1 S.D. 34.6* S.D. 2.8 S.D. 0 6 Mean S.D. 29 S.D. 0.4 S.D. 1.3 S.D. 1.0 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.5 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.5 S.D. 0.5 S.D. 0.4 S.D. 0.4 S.D. 0.5 S.D. 0.5 S.D. <td>Dose mg/kg No. x10°/µL g/dL % fL pg g/dL % x10°/µL 0 6 Mean S.D. 883 16.3 46.3 52.5 18.4 35.1 2.3 111.0 0.5 0.3 0.4 9.1 1000 6 Mean 875 15.8 45.7 52.3 18.1 34.6 2.8 114.6 S.D. 43 0.5 1.4 1.1 0.5 0.4T 0.5 7.5 0 6 Mean S.D. 43 0.5 1.4 1.1 0.5 0.4T 0.5 7.5 0 6 Mean S.D. 29 0.4 1.3 1.0 0.5 0.3 0.4 15.1 1000 6 Mean 818 14.7 41.6 50.9 18.0 35.4 2.5 136.2</td> <td>Dose mg/kg No. x10⁴/µL g/dL % fL pg g/dL % x10⁴/µL s 0 6 Mean S.D. 26 0.4 1.1 1.6 0.5 0.3 0.4 9.1 1.5 1000 6 Mean S75 S.D. 15.8 45.7 52.3 18.1 34.6* 2.8 114.6 16.1 S.D. 43 0.5 1.4 1.1 0.5 0.4T 0.5 7.5 1.9 0 6 Mean S03 S.D. 14.6 41.0 51.1 18.2 35.6 2.4 124.8 11.8 S.D. 29 0.4 1.3 1.0 0.5 0.3 0.4 15.1 0.1 1000 6 Mean S18 14.7 41.6 50.9 18.0 35.4 2.5 136.2 11.9</td> <td>Dose mg/kg No. x10°/µL g/dL % fL pg g/dL % x10°/µL s s 0 6 Mean S.D. 26 0.4 1.1 1.6 0.5 0.3 0.4 9.1 1.5 2.0 1000 6 Mean 875 S.D. 15.8 45.7 52.3 18.1 34.6* 2.8 114.6 16.1 23.2 5.0 1.4 1.1 0.5 0.4T 0.5 7.5 1.9 3.1 0 6 Mean 803 14.6 41.0 51.1 18.2 35.6 2.4 124.8 11.8 18.6 S.D. 29 0.4 1.3 1.0 0.5 0.3 0.4 15.1 0.1 2.6 100 0.5 0.3 0.4 15.1 0.1 2.6 100 0.5 0.3 0.4 15.1 0.1 2.6 1000 6 Mean 818 14.7 41.6 50.9 18.0 35.4 2.5 136.2 11.9 20.3</td> <td>Dose mg/kg No. x10°/µL g/dL % fL pg g/dL % x10°/µL s s mg/dL 0 6 Mean 883 16.3 46.3 52.5 18.4 35.1 2.3 111.0 14.4 24.0 311 S.D. 26 0.4 1.1 1.6 0.5 0.3 0.4 9.1 1.5 2.0 30 1000 6 Mean 875 15.8 45.7 52.3 18.1 34.6* 2.8 114.6 16.1 23.2 308 S.D. 43 0.5 1.4 1.1 0.5 0.4T 0.5 7.5 1.9 3.1 19 0 6 Mean 803 14.6 41.0 51.1 18.2 35.6 2.4 124.8 11.8 18.6 262 S.D. 29 0.4 1.3 1.0 0.5 0.3 0.4 15.1 0.1 2.6</td>	Dose mg/kg No. x10°/µL g/dL % fL pg g/dL % x10°/µL 0 6 Mean S.D. 883 16.3 46.3 52.5 18.4 35.1 2.3 111.0 0.5 0.3 0.4 9.1 1000 6 Mean 875 15.8 45.7 52.3 18.1 34.6 2.8 114.6 S.D. 43 0.5 1.4 1.1 0.5 0.4T 0.5 7.5 0 6 Mean S.D. 43 0.5 1.4 1.1 0.5 0.4T 0.5 7.5 0 6 Mean S.D. 29 0.4 1.3 1.0 0.5 0.3 0.4 15.1 1000 6 Mean 818 14.7 41.6 50.9 18.0 35.4 2.5 136.2	Dose mg/kg No. x10 ⁴ /µL g/dL % fL pg g/dL % x10 ⁴ /µL s 0 6 Mean S.D. 26 0.4 1.1 1.6 0.5 0.3 0.4 9.1 1.5 1000 6 Mean S75 S.D. 15.8 45.7 52.3 18.1 34.6* 2.8 114.6 16.1 S.D. 43 0.5 1.4 1.1 0.5 0.4T 0.5 7.5 1.9 0 6 Mean S03 S.D. 14.6 41.0 51.1 18.2 35.6 2.4 124.8 11.8 S.D. 29 0.4 1.3 1.0 0.5 0.3 0.4 15.1 0.1 1000 6 Mean S18 14.7 41.6 50.9 18.0 35.4 2.5 136.2 11.9	Dose mg/kg No. x10°/µL g/dL % fL pg g/dL % x10°/µL s s 0 6 Mean S.D. 26 0.4 1.1 1.6 0.5 0.3 0.4 9.1 1.5 2.0 1000 6 Mean 875 S.D. 15.8 45.7 52.3 18.1 34.6* 2.8 114.6 16.1 23.2 5.0 1.4 1.1 0.5 0.4T 0.5 7.5 1.9 3.1 0 6 Mean 803 14.6 41.0 51.1 18.2 35.6 2.4 124.8 11.8 18.6 S.D. 29 0.4 1.3 1.0 0.5 0.3 0.4 15.1 0.1 2.6 100 0.5 0.3 0.4 15.1 0.1 2.6 100 0.5 0.3 0.4 15.1 0.1 2.6 1000 6 Mean 818 14.7 41.6 50.9 18.0 35.4 2.5 136.2 11.9 20.3	Dose mg/kg No. x10°/µL g/dL % fL pg g/dL % x10°/µL s s mg/dL 0 6 Mean 883 16.3 46.3 52.5 18.4 35.1 2.3 111.0 14.4 24.0 311 S.D. 26 0.4 1.1 1.6 0.5 0.3 0.4 9.1 1.5 2.0 30 1000 6 Mean 875 15.8 45.7 52.3 18.1 34.6* 2.8 114.6 16.1 23.2 308 S.D. 43 0.5 1.4 1.1 0.5 0.4T 0.5 7.5 1.9 3.1 19 0 6 Mean 803 14.6 41.0 51.1 18.2 35.6 2.4 124.8 11.8 18.6 262 S.D. 29 0.4 1.3 1.0 0.5 0.3 0.4 15.1 0.1 2.6

^{• :} p<0.05 (Significant difference from control group)
T : Student's t-test

Table 6-5 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Hematology (After recovery period)

C	Dane	N-		WBC		Differential	leuko	cyte counts	(%)		
Sex	mg/kg	No.		×10²/μL	LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC	
Male	0	6	Mean S.D.	105.1 17.4	79.5 7.1	16.5 6.9	1.1	0.4	1.7	0.9 0.2	
	1000	6	Mean S.D.	103.8 17.9	82.5 4.1	14.0 4.1	0.7	0.3 0.2	1.5	1.0	
Female	0	6	Mean S.D.	77.1 17.3	77.1 5.7	18.5 5.6	1.4	0.3 0.1	1.8	0.9	
	1000	6	Mean S.D.	59.8 14.9	75.9 3.7	20.0	1.0	0.3	1.8	1.0 0.4	

LUC: Large unstained cells
No significant difference between treated group and control group.

Table 6-6 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Hematology (After recovery period)

C	D			Dif	ferential	leukocyte	counts	(X10³/µL)		
Sex	Dose mg/kg	No.		LYMP	NEUT	EOS	BAS0	MONO	LUC	
Male	0	6	Mean S.D.	83.8 16.9	17.2 7.7	1.1	0.4	1.8 0.2	0.9	
	1000	6	Mean S.D.	85.9 16.3	14.4 4.7	0.7• 0.3T	0.4	1.6	1.0 0.5	
Female	0	6	Mean S.D.	59.6 15.1	14.3 5.8	1.0	0.2	1.3	0.7	
	1000	6	Mean S.D.	45.3 10.8	12.1 4.5	0.6. 0.3T	0.2	1.1	0.7	

LUC: Large unstained cells
•: p<0.05 (Significant difference from control group)
T: Student's t-test

Table 7-1 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks
Blood chemistry (After administration period)

Dogg	No	7.= -5/12	AST	ALT	LDH	7-GTP	ALP	т-сно	TG	PL	T-BIL	GLU	1
mg/kg	NO.		IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	
0	6	Mean S.D.	63 8	29 4	59 12	1	660 177	55 12	56 22	96 15	0.1	133 9	
40	6	Mean S.D.	66 6	26 2	51 6	1 0	579 35	49	51 19	88 13	0.1	119 14	
200	6	Mean S.D.	65 4	27 3	51 9	0	643 43	54 11	62 24	90 15	0.1	124 10	
1000	6	Mean S.D.	67 9	30	63 17	1	643 140	65 15	46 23	102 18	0.1	119 7	
0	6	Mean S.D.	75 21	25 3	52 16	2	409 77	66 7	17 5	106	0.1	101 12	
40	6	Mean S.D.	63 10	24 3	45 8	1	423 81	62 15	20 9	106 25	0.1	112 15	
200	6	Mean S.D.	64 8	24 4	41 9	0	350 98	70 18	19 11	117 31	0.1	108 10	
1000	6	Mean S.D.	66	25 4	55 9	0	337 107	57 13	11 2	97 19	0.1	102	
	0 40 200 1000 0 40 200	0 6 40 6 200 6 1000 6 40 6 200 6	mg/kg 0 6 Mean S.D. 40 6 Mean S.D. 200 6 Mean S.D. 1000 6 Mean S.D. 40 6 Mean S.D. 40 6 Mean S.D. 200 6 Mean S.D. 1000 6 Mean S.D.	Dose mg/kg No. 0 6 Mean S.D. 63 S.D. 40 6 Mean S.D. 66 S.D. 200 6 Mean S.D. 4 1000 6 Mean S.D. 9 0 6 Mean S.D. 9 0 6 Mean S.D. 10 200 6 Mean S.D. 63 S.D. 200 6 Mean S.D. 64 S.D.	Dose mg/kg No. IU/L IU/L 0 6 Mean S.D. 63 29 4 40 6 Mean 66 26 26 20 6 20 6 20 6 6 20 6 20 6 6 20 6 6 20 6 6 20 6 6 20 6 20 6 20 6 7 6 7 6 7 6 7 6 7 6 7 7 7 7 7 7 7 7	Dose mg/kg No. IU/L IU/L IU/L IU/L 0 6 Mean 63 29 59 59 5.D. 8 4 12 40 6 Mean 66 26 51 51 5.D. 6 2 6 200 6 Mean 65 27 51 5.D. 5.D. 1000 6 Mean 67 30 63 5.D. 63 17 0 6 Mean 75 25 52 5.D. 52 52 5.D. 40 6 Mean 63 24 45 5.D. 45 5.D. 200 6 Mean 64 24 41 5.D. 8 4 9	Dose mg/kg No. IU/L IU/L	Dose mg/kg No. IU/L IU/L	Dose mg/kg No. IU/L mg/dL 0 6 Mean S.D. 63 29 59 1 660 55 5.D. 8 4 12 0 177 12 40 6 Mean Mean Mean Mean Mean Mean Mean Mean	Dose mg/kg No. IU/L IU/L	Dose mg/kg No. IU/L mg/dL mg/dL </td <td> Dose No. </td> <td> Dose No. IU/L IU/L IU/L IU/L IU/L mg/dL mg</td>	Dose No.	Dose No. IU/L IU/L IU/L IU/L IU/L mg/dL mg

Table 7-2 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Blood chemistry (After administration period)

	D	W		BUN	CRNN	Na	K	Cl	Ca	P	TP	ALB	A/G
Sex	Dose mg/kg	No.		mg/dL	mg/dL	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	
	0	6	Mean S.D.	13 2	0.25	144	5.0 0.3	107 2	9.7	8.3	6.0	3.0 0.1	1.02 0.05
fale	40	6	Mean S.D.	12 1	0.25	144	5.1 0.2	108 1	9.7	7.4* 0.4D	6.0	3.1 0.1	1.06 0.08
	200	6	Mean S.D.	12 2	0.25	144	5.1 0.2	108	9.7	7.9 0.3	6.0	3.1 0.1	1.05 0.04
	1000	6	Mean S.D.	15 2	0.24	143 2	5.2 0.4	108 1	9.7	8.2	6.1 0.2	3.1 0.1	1.03
	0	6	Mean S.D.	16 3	0.30 0.04	143	4.7 0.3	109 2	9.8 0.2	7.7 0.5	6.2 0.1	3.2 0.1	1.04 0.08
emale	40	6	Mean S.D.	16 1	0.27	144 1	4.8 0.3	109	9.9	8.3	6.1	3.2 0.1	1.09 0.10
	200	6	Mean S.D.	16 3	0.26 0.05	144 1	5.2* 0.3D		9.8	7.7	6.2	3.2	1.06 0.12
	1000	6	Mean S.D.	17 2	0.26	143 1	5.1. 0.2D		9.7	8.2	6.3	3.3	1.08

^{• :} p<0.05 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 7-3 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks
Blood chemistry (After recovery period)

Sex	Dose	No.		AST	ALT	LDH	γ −GTP	ALP	T-CHO	TG	PL	T-BIL	GLU	
	mg/kg	NO.		IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	
fale	0	6	Mean S.D.	64 5	28 6	63 16	1	524 82	62 10	53 14	104 10	0.1	137 18	
	1000	6	Mean S.D.	65 9	25 2	61 11	1	504 119	54 8	56 15	95 14	0.1	136 21	
emale	0	6	Mean S.D.	58 4	22 3	48 12	1 0	348 109	68 15	20 8	122 24	0.1	134 18	
	1000	6	Mean S.D.	70 14	26 8	53 14	1 0	302 63	70 15	20 9	127 19	0.1	123 13	

Table 7-4 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks
Blood chemistry (After recovery period)

	Dose	No.		BUN	CRNN	Na	K	Cl	Ca	P	TP	ALB	A/G
Sex	mg/kg	NO.		mg/dL	mg/dL	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	
ale	0	6	Mean S.D.	14 1	0.28	144 1	4.6	106	9.9	7.0 0.2	6.3	3.2 0.1	1.01
	1000	6	Mean S.D.	13 2	0.25 0.03	145 2	4.7 0.2	107	9.8	7.3 0.6	6.2	3.1	1.04
emale	0	6	Mean S.D.	16 1	0.32 0.03	143 1	4.1 0.2	109	10.1 0.1	5.6 0.7	6.5	3.3 0.2	1.04 0.05
	1000	6	Mean S.D.	15 1	0.30	143	4.3	110	10.0 0.3	5.7	6.6	3.5	1.11

Table 8-1 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Absolute and relative organ weight (After administration period) Male

	Dose mg/kg		Body weight	Brain g(g/100g BW)	Thymus mg(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)
	0	No. Mean S.D.	377 33	1.96 0.09	6 509 162	1.25 0.12	10.82 1.63	0.74 0.17	2.74 0.26	6 65 15
bsolute	40	No. Mean S.D.	375 39	2.06 0.08	501 199	$\begin{smallmatrix}1 & 21 \\ 0 & 12 \end{smallmatrix}$	10.16 0.91	0.67 0.06	2.81 0.18	6 60 6
	200	No. Mean S.D.	376 21	2.02 0.04	472 65	1.25 0.06	10.45 0.92	0.68 0.10	2.98 0.15	6 66 9
	1000	No. Mean S.D.	359 16	2.01 0.09	444 68	$\begin{smallmatrix}1.28\\0.06\end{smallmatrix}$	10.45 0.37	0.74 0.10	3.24• 0.35D	• 64 13
	0	No. Mean S.D.		6 0.53 0.05	133 31	0.33 0.03	2.86 0.26	0.19 0.03	0.73 0.04	17 3
Relative	40	No. Mean S.D.		0.55 0.04	6 134 53	0.33 0.01	2.72 0.06	0.18 0.02	0.76 0.10	16 2
	200	No. Mean S.D.		0.54 0.02	126 18	0.33 0.02	2.78 0.14	0.18 0.02	0.79 0.05	6 18 2
	1000	No. Mean S.D.		0.56 0.02	124 19	0.36 0.02	2.92 0.07	$\begin{smallmatrix}0.21\\0.02\end{smallmatrix}$	0.90+ 0.08D	• 18 4

^{•• :} p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 8-2

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Male

	Dose mg/kg		Testis (R+L) g(g/100g BW)	Epididymis (R+L) mg(mg/100g BW)	
	0	No. Mean S.D.	3.15 0.19	6 854 87	
Absolute	40	No. Mean S.D.	3.10 0.25	778 87	
	200	No. Mean S.D.	3.22 0.23	824 31	
	1000	No. Mean S.D.	3.12 0.38	789 72	
	0	No. Mean S.D.	0.84 0.06	227 17	
Relative	40	No. Mean S.D.	0.83 0.06	209 25	
	200	No. Mean S.D.	0.86 0.08	220 17	
	1000	No. Mean S.D.	0.87 0.12	220 21	

Table 8-3 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Absolute and relative organ weight (After administration period) Female

	Dose mg/kg		Body weight	Brain g(g/100g BW)	Thymus ng(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)
	0	No. Mean S.D.	227 6	1.91 0.06	6 461 85	0.79 0.07	6.12 0.25	0.49 0.08	1.63 0.10	6 68 11
bsolute	40	No. Mean S.D.	228 17	1.87 0.08	6 448 127	0.81 0.09	6.14 0.63	0.46 0.05	1.68 0.14	6 69 12
	200	No. Mean S.D.	225 10	1.88 0.07	6 414 150	0.81 0.07	6.36 0.68	0.50 0.09	1.75 0.20	67 9
	1000	No. Mean S.D.	217 14	1.88 0.03	458 117	0.76 0.05	6.15 0.61	0.48 0.13	1.75 0.12	68 10
	0	No. Mean S.D.		0.84 0.04	6 204 39	0.35 0.03	2.70 0.09	0.22 0.04	0.72 0.04	30 5
elative	40	No. Mean S.D.		6 0.83 0.08	6 198 62	0.35 0.02	2.69 0.11	0.20 0.03	0.74 0.03	6 30 5
	200	No. Mean S.D.		0.84 0.05	183 63	0.36 0.03	2.83 0.24	0.22 0.04	0.78 0.06	6 30 4
	1000	No. Mean S.D.		0.87 0.06	6 210 43	0.35 0.02	2.84 0.23	0.22 0.05	6 0.81 0.060	32 4

^{•• :} p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 8-4 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks
Absolute and relative organ weight (After administration period)
Female

	Dose	ne(i	Ovary (R+L) ng/100g BW)	Uterus mg(mg/100g BW)
	-0		J. 1116 211/	-5,-6,-00, 21,
	0	No. Mean S.D.	84.8 9.8	6 421 118
Absolute	40	No. Mean S.D.	80.7 7.0	430 100
	200	No. Mean S.D.	85.9 13.6	6 461 92
	1000	No. Mean S.D.	87.1 11.2	433 86
	0	No. Mean S.D.	37.4 5.0	185 51
Relative	40	No. Mean S.D.	35.6 4.5	188 41
	200	No. Mean S.D.	38.4 7.0	205 41
	1000	No. Mean S.D.	40.1 2.9	200 37

Table 8-5

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Male

	Dose		Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)
	mg/kg			g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	420	2.05	439	1.30	11.50	0.66	2.95	63
		S.D.	420 16	0.07	439 80	0.09	0.83	0.16	0.13	63 11
	1000	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	420 55	2.02	6 461 79	1.35	11.02	0.65	3.05	6 67 8
		S.D.	55	0.11	79	0.16	1.50	0.09	0.36	8
Relative	0	No.		6	6	6	6	6	6	6
	-	Mean		0.49	104	0.31	6 2.74	0.16	0.70	15
		S.D.		0.02	104 17	0.02	0.16	0.04	0.02	6 15 3
	1000	No.		6	6	6	6	0.16	0.73	6 16 2
		Mean		0.49	112 28	0.32	2.62		0.73	16
		S.D.		0.06	28	0.04	0.05	0.02	0.07	2

Table 8-6

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Male

	Dose mg/kg		Testis (R+L) g(g/100g BW)	(R+L)	
Absolute	0	No. Mean S.D.	3.17 0.35	6 1071 53	
	1000	No. Mean S.D.	3.18 0.27	6 1045 118	
Relative	0	No. Mean S.D.	6 0.75 0.08	6 255 11	
	1000	No. Mean S.D.	6 0.76 0.08	6 251 35	

Table 8-7

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Female

	Dose mg/kg		Body weight	Brain g(g/100g RW)	Thymus mg(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)
										4.0
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	269	1.98	461	0.90	7.52	0.57	1.86	80
		S.D.	15	0.06	461 171	0.03	0.50	0.07	0.10	6 80 13
	1000	No.	6	6	6	6	7.21	6 0.51	6	6
		Mean	257	1.92	371	0.90	7.21	0.51	1.89	81
		S.D.	257 29	0.06	6 371 77	0.09	0.85	0.09	0.20	6 81 18
Relative	0	No.		6	6		6	6	6	6
nerative	•	Mean		0.74	171	0.33	2.80	0.21	0.69	30
		S.D.		0.04	171 61	0.01	0.18	0.03	0.05	30 5
		3.0.		0.04	01	0.01	0.10	0.00	0.00	
	1000	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.75	144 24	0.35	2.81	0.20	0.74	32
		S.D.		0.07	24	0.03	0.12	0.02	0.06	5

Table 8-8

A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Female

	Dose mg/kg		(R+L)		
	mg/kg	mg(mg/100g BW)		mg(mg/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	
reces en artic	0.000	Mean	102.8	571	
		S.D.	102.8 22.6	571 65	i
	1000	No.	100.1		
		Mean	100.1	554	
		S.D.	20.5	554 85	
Relative	0	No.	8	A	
MOZGOZIC	•	Mean	38.5	213	
		S.D.	38.5 10.0	8 213 23	i e e e e e e e e e e e e e e e e e e e
	1000	No.	6	218 45	i e
		Mean	39.4 9.3	218	1
		S.D.	9.3	45	i

Table 9-1 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Gross pathological findings (After administration period)

Organs	Dose(mg/kg):	M	M 40	200	1000	F	40	200	1000	
Findings	Number:	6	8	6	6	6	6	6	6	
Epididymis	3000000									
Small Kidney		0	1	0	1	-	-	-	-	
Discoloration, d	lark	0	1	6	6	0	5	6	6	
Pituitary		-	-	-	-		177	0.75		
Cyst		0	1	0	0	0	0	0	0	
Stomach		-	2			12	-			
Focus, raised, fo	restomach	0	ō	ō	o	o	o	o	1	
Focus, dark red,	glandular stomach	0	0	0	0	0	0	2	0	
Testis Small		0	1	0	1	_	-	-	-	

M : Male. F : Female - : Not applicable

Table 9-2 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks

Gross pathological findings (After recovery period)

Organs	Sex:	м	м	R	F	
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0	1000	0	1000	
Kidney Discoloration.dark Lung(bronchus)		0	2	0	5	
Focus.dark red		0	1	0	0	
ymph node, pancreatic Nodule		0	0	0	1	
Stomach Focus, raised, serosa	1	0	0	1	0	

M : Male, F : Female

Table 10-1 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks
Histopathological findings (After administration period)

Organs	Sex: Dose(mg/kg):	M	M 40	200	1000	F 0	F 40	200	1000	
Findings	Number:	6	6	6	6	6	6	200	6	
Adrenal									200	
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6	
Not remarkable	20	6	0	0	6	6	0	0	6	
Bone+Bone marrow, femora	1	-	-		-		-	-	-	
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6	
Not remarkable	•	6	0	0	6	6	0	0	6	
Bone+Bone marrow, sterna	1		•		_		•	•		
Number examined		6	0	0	6	6	8	0	6	
Not remarkable		6	0	0	6	6	O	0	6	
Cerebrum			0	0	•		0	0	6	
Number examined Not remarkable		0	ő	0	6	6	ŏ	ŏ	6	
		0	U	U	0	0	U	U	0	
Cerebellum			0	0			^	0	6	
Number examined Not remarkable		6	ŏ	ŏ	6	6	8	ŏ	6	
Epididymis		•	U	U	0	•	0	0	0	
Number examined		•	1	0	6	-	-		_	
Not remarkable		2	ō	ŏ	4	_	_	_	_	
Cell infiltration, in	teretitie1	1	ŏ	ŏ		_	_	_	_	
minimal	terstitian	1	ŏ	ŏ	2 2 0	_	_	_	_	
Hypospermia		å	1	ŏ	ő	_	-	-	-	
severe		ŏ	1	ŏ	ŏ	_	-	_	_	
Cell debris, lumen		ŏ	ī	ŏ	1	_	_	-	_	
minimal		ŏ	â	ŏ	î	-	-	-	-	
mild		ŏ	1	ŏ	ō	4	-	-	-	
Еуе		•	-	U	U					
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6	
Not remarkable		6	ŏ	ŏ	5	ě	0	ŏ	6	
Dysplasia, retinal, fo	cal	ŏ	ŏ	ŏ	ĭ	6	0	0	0	
minimal	Cux	ŏ	ŏ	ŏ	î	ŏ	ŏ	ŏ	Ŏ	
Granuloma, calcific, c	onfunctiva	õ	Õ	Ö	î	0	0	0	0	
minimal	ong one or a	ŏ	Õ	ŏ	ī	0	Ö	0	0	
Heart			-				1886	100		
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6	
Not remarkable		5	0	0	4	6	0	0	6	
Myocarditis, focal		1	0	0	2	0	0	0	0	
minimal		1	0	0	2	0	0	0	0	
Intestine, duodenum						27	220		-	
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6	
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6	
Intestine.jejunum Number examined		-		-	-		~			
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6	
Not remarkable	and the second second	6	0	0	6	6	0	0	6	
Intestine, ileum (Peyer's	patch)		-				•		•	
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6	
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6	
Intestine, cecum		-	_	-	•	•	•			
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6	
Not remarkable		4	4	0	0	5	4	1	0	
Cell infiltration, mu	cosal	1	0	0	o	0	0	1	0	
minimal		1	0	0	0	U	U	1	v	

M : Male, F : Female - : Not applicable

Table 10-2 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Histopathological findings (After administration period)

Organs	Dogg/mg/kg):	M	40	200	1000	F	F	200	1000	
Findings	Dose(mg/kg): Number:	ě	6	6	6	6	6	6	6	
Intestine.cecum (contine Hyperplasia.mucosal	ued)									
Hyperplasia, mucosal		1	2 2 0	5	6	1	2 2 0	4	6	
minimal		1	2	5	4 2	1	2	4	4	
mild		0	0	0	2	ō	0	0	2	
Intestine, colon			-	_	_		-		~	
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6	
Not remarkable		6	6	5	0	6	6	2	5	
Hyperplasia, mucosal		0	0	1	6	0	0	4	5	
minimal		Ö	O	1	2	0	Ö	4	4	
mild		0	0	0	4	0	0	0	1	
Intestine, rectum			_				•			
Number examined		6	6 0 0	6	6	6 0 0	6 6 0	6	6 2	
Not remarkable		6	6	6	5	6	6	6	2	
Hyperplasia, mucosal		0	ŏ	8	0	ŏ	ŏ	8	4 3	
minimal mild		o o	ŏ	ő		ŏ	ŏ	ő		
Kidney		0	U	O	1	0	U	U	1	
Number examined		0	6	6	6	6	6	•	6	
Not remarkable		9	5	4	•	9	4	4	ŏ	
Regeneration, tubular		2	1	2	5	7	2	1	1	
minimal		2	î	5	4	1	5	1	1	
mild		ő	ā	ő	1	ō	2 2 0	ō	ō	
Eosinophilic droplet	tubular cell	ŏ	ŏ	2 0 0	3	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	
minimal	, cuouxar cexx	ŏ	ŏ	ŏ	2	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	
mild		ŏ	ŏ	ŏ	ī	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	
Cell infiltration, in	terstitial	ŏ	ŏ	ĭ	ô	ĭ	ĭ	ŏ	ĭ	
minimal	CLOTLULAL	ŏ	ŏ	ĩ	ŏ	ī	î	ŏ	ĩ	
Brown pigment, tubular	r cell	ŏ	ŏ	ō	ŏ	ō	ō	ĭ	6	
minimal		ŏ	ŏ	ŏ	0	ŏ	Ŏ	ī	6	
Liver			-	-		-	7.75	-	(4.50)	
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6	
Not remarkable		2	0	0	2	2	0	0	1 5	
Microgranuloma		4	Ō	ō	4	4	Ō	0	5	
minimal		4	0	0	4	4	0	0	5	
Lung(bronchus)					N. P.				1600	
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6	
Not remarkable		5	0	0	4	6	0	0	6	
Mineralization, arter	ial wall	0	0	0	2 2	0	0	0	0	
minimal		0	ŏ	0		0	0	0	0	
Accumulation, alveola	r macrophage	0	0	0	1	0	00000	0000	0000	
minimal		0	0	0	1	0	0	0		
Pneumonia, focal		1	0	O	0	0	O.	0	8	
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0	
Lymph node.mesenteric			•			•	•	•	•	
Number examined		6	0	0	6	6	ō	0	6	
Not remarkable		6	0	0	8	6	0	0	6	
Lymph node, submandibula	r		_				•		•	
Number examined		6	Ŏ	0	6	6	8	8	6	
Not remarkable		6	0	0	6	6	O	0	0	

M : Male, F : Female

Table 10-3 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Histopathological findings (After administration period)

Organs	Dose(mg/kg):	M	M 40	200	1000	F	40	200	1000 F	
Findings	Number:	6	6	6	6	6	6	6	6	
Ovary							_			
Number examined			-	=	-	6	O	0	6	
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6	
Parathyroid			~	•			•	•		
Number examined Not remarkable		9	8	8	6	6	8	0	6	
Pituitary		•	U	U	6	0	U	U	0	
Number examined			1	0	8	6	0	0	6	
Not remarkable		2	ō	ŏ	6	6	ŏ	ŏ	6	
Aborrent oranio	pharyngeal tissue	0	1	ŏ	õ	ő	0	ŏ	ő	
mild	pharyngear crasue	ŏ	ī	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	
Prostate		U	1	U	U	U	U	U	U	
Number examined		•	0	0	6	1/4	-	-	-	
Not remarkable		9	ŏ	ő	Š	-	_	_	_	
Cell infiltrati	on interestities	3	ŏ	ŏ		-	-	-		
minimal	on, interstitual	2	ŏ	ŏ	1	_	_	-		
Sciatic nerve		0	U	U	1	-	_	-		
Number examined			0	0	0	6	0	0	6	
Not remarkable		9	ŏ	ŏ	6	6	ŏ	ŏ	6	
Not remarkable	maya1	0	U	U	6	0	U	U	0	
Skeletal muscle, fer Number examined	mora1		0	0		6	0	0	6	
Not remarkable		9	ŏ	ŏ	6	6	ŏ	ŏ	5	
Degeneration/ne	amanda musaulam	0	ŏ	ŏ	9	õ	ŏ	ŏ	1	
minimal	crosis, muscular	ŏ	ŏ	ŏ	i	ŏ	0	ŏ	1	
Spinal cord, thorac	10	v	U	U		v	U	U	1	
Number examined			0	0	6		0	0	8	
Not remarkable		2	ŏ	ŏ	6	6	8	8	6	
Spleen		•	0	v	0	•	0	•	•	
Number examined		0	0	0	6	6	0	0	a	
Not remarkable		ě	ŏ	ŏ	6	6	ŏ	ŏ	ĕ	
Stomach		0	U	U	O	•	U	•	•	
Number examined		e	0	0	6	6	0	2	6	
Not remarkable		ě	ŏ	ŏ	ĕ	ĕ	ŏ	ő	5	
Erosion, glandul	er stomach	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	2	ŏ	
minimal	ar scomeon	ň	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	1	ŏ	
mild		ň	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	ī	ŏ	
Hyperplasia, squ	emons forel	ň	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	000	ō	ĭ	
mild	amous, rocar	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	ŏ	î	
Cestis		U	U	U	U	U	U	•		
Number examined		e	1	0	6	-	-	-	-	
Not remarkable		6	Ô	Ö	5	-	100	_	_	
Atrophy, seminif	orone tubular	0	1	o	ĭ	-	-	-	_	
mild	erous buourar	0	ā	ŏ	i	-	-	-	-	
severe		ŏ	ĭ	ŏ	ō	-	-	_	_	
Thyroid		U		U	U					
Number examined		£	0	0	в	6	0	0	6	
Not remarkable		5	ŏ	ŏ	6	5	O	ŏ	4	
Cyst.ultimobran	chial	ĭ	ŏ	ŏ	ŏ	1	ŏ	ŏ	2	
minimal	Сптат	1	ŏ	ŏ	ŏ	î	0	ŏ	2	
militangr		-	•	•	•	-	•	-	-	

M : Male, F : Female - : Not applicable

Table 10-4 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Histopathological findings (After administration period)

Organs Findings	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 40 6	200 6	1000 6	F 0 6	40 6	200 6	1000 6	
11 / A West Control	Algertation									
Thymus Number examined Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6	
Trachea		•	U	U	0	0	U	v	0	
Number examined Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6	
Irinary bladder		•	•	•	•	U	U	•	•	
Jrinary bladder Number examined Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6	
Iterus										
Number examined Not remarkable		-	Ξ	2	=	6	8	0	6	

M : Male, F : Female - : Not applicable

Table 10-5 A 28-day oral toxicity study of Mordant Black-7 in rats with a recovery period of 2 weeks Histopathological findings (After recovery period)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M	1000 1000	F	1000	
Findings	Number:	6	6	6	6	
Intestine.cecum	2					
Number examined		6	6	6	6	
Not remarkable		5	6	5	6	
Cell infiltration, mucosal		1	0	1	0	
minimal		1	0	1	0	
Intestine, colon						
Number examined		6	6	6	6	
Not remarkable		6	6	6	6	
Intestine.rectum				-	1.00	
Number examined		6	6	6	6	
Not remarkable		6	6	6	6	
Kidney						
Number examined		6	6	6	6	
Not remarkable		4	5	4	4	
Regeneration.tubular		1	1	2	2	
minimal		1	1	2	2	
Eosinophilic droplet, tubular cell		1	0	Q	Ō	
minimal		1	0	0	0	
ung(bronchus)						
Number examined		Ō	1	0	Q.	
Pneumonia, focal		ō	1	0	0	
minimal		0	1	0	o o	
Metaplasia, osseous		0	1	0	o o	
minimal		0	1	U	U	
Lymph node, pancre	atic	•	•	•		
Number examined		Ö	0	0	÷	
Lymphadenitis		Ö	0	Ŏ	1	
mild		0	0	U	7	
tomach		^	•		0	
Number examined		ŏ	o o	+	0	
Cyst, inclusion		o o	, ,	1	0	
mild		U	O	*	U	

M : Male, F : Female