



D & C Red 7

[3-ヒドロキシ-4-[(4-メチル-2-スルホフェニル)アゾ]-2-ナフタレンカルボン酸のカルシウム塩]

のラットにおける
反復投与毒性・生殖発生毒性
併合試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦 野 研 究 所

目 次

	頁
要 約	1
緒 言	5
試験材料および方法	6
1. 被験物質	6
2. 使用動物および飼育条件	6
3. 群分け法	7
4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法	7
5. 予備試験（投与量の設定）	7
6. 観察方法	9
7. 動物の個体識別法	12
8. 統計処理	13
結 果	14
I. 反復投与毒性（親動物所見）	14
II. 生殖発生毒性	19
1. 生殖学的検査所見	19
2. 出生児所見	19
考 察	21
文 献	22

Tables (Table P1 ~ Table P10; Table 1 ~ Table 28)

【TABLE INDEX】

I. Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

TABLES (APPENDIXES)	TABLE TITLE
P1 (P1-1, P1-2)	Body weight of males in the treatment period
P2 (P2-1, P2-2)	Body weight gain data of males in the treatment period
P3 (P3-1, P3-2)	Body weight of females in the treatment period
P4 (P4-1, P4-2)	Body weight gain data of females in the treatment period
P5 (P5-1, P5-2)	Food consumption of males in the treatment period
P6 (P6-1, P6-2)	Food consumption of females in the treatment period
P7 (P7-1, P7-2)	Absolute and relative organ weight of males
P8 (P8-1, P8-2)	Absolute and relative organ weight of females
P9 (P9)	Summary of macroscopic findings
P10 (P10)	Summary of histopathological findings

II. Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

TABLES (APPENDIXES)	TABLE TITLE
1 (1-1 ~ 1-4)	Summary of clinical signs of F ₀ males
2 (2-1 ~ 2-4)	Summary of clinical signs of F ₀ females
3 (3-1 ~ 3-4)	Body weight of F ₀ males in the treatment period
4 (4-1 ~ 4-4)	Body weight gain data of F ₀ males in the treatment period
5 (5-1 ~ 5-4)	Body weight of F ₀ females in the pre-mating period
6 (6-1 ~ 6-4)	Body weight gain data of F ₀ females in the pre-mating period
7 (7-1 ~ 7-4)	Body weight of F ₀ females in the pregnant period
8 (8-1 ~ 8-4)	Body weight gain data of F ₀ females in the pregnant period
9 (9-1 ~ 9-4)	Body weight of F ₀ females in the lactation period
10 (10-1 ~10-4)	Body weight gain data of F ₀ females in the lactation period

11	(11-1 ~11-4)	Food consumption of F ₀ males in the treatment period
12	(12-1 ~12-4)	Food consumption of F ₀ females in the pre-mating period
13	(13-1 ~13-4)	Food consumption of F ₀ females in the pregnant period
14	(14-1 ~14-4)	Food consumption of F ₀ females in the lactation period
15	(15-1 ~15-4)	Summary of hematological findings of F ₀ males
16	(16-1 ~16-4)	Summary of biochemical findings of F ₀ males
17	(17-1 ~17-4)	Summary of macroscopic findings in male rats administered D & C Red 7 for 42 days
18-1	(18-1 ~18-4)	Summary of macroscopic findings in female rats administered D & C Red 7
18-2		" (Subjected to autopsy on day 4 of lactation)
18-3		" (Not pregnant)
18-4		" (Total implantation loss)
18-5		" (Total litter loss)
18-6		" (Not copulated)
19	(19-1 ~19-4)	Absolute and relative organ weight of F ₀ males
20	(20-1 ~20-4)	Absolute and relative organ weight of F ₀ females
21		Absolute and relative organ weight of F ₀ females; organ weight of animals which sacrificed on the way of test period
22	(22-1 ~22-4)	Summary of histopathological findings in male rats administered D & C Red 7 for 42 days
23-1	(23-1 ~23-4)	Summary of histopathological findings in female rats administered D & C Red 7
23-2		" (Subjected to autopsy on day 4 of lactation)
23-3		" (Not pregnant)
23-4		" (Total implantation loss)
23-5		" (Total litter loss)
23-6		" (Not copulated)
24	(24-1 ~24-4)	Summary of reproductive performance
25	(25-1 ~25-4)	Summary of development of F1 pups up to day 4 of lactation
26	(26-1 ~26-4)	Body weight of F1 pups up to day 4 of lactation
27		Summary of morphological observation of pups
28		Summary of morphological observation of F1 dead pups

既存化学物質安全性スクリーニング試験の一つとして D & C Red 7 (以下 DCR7) の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行った。すなわち DCR7 の 0 (溶媒対照)、100、300 および 1000 mg/kg を Sprague-Dawley 系 (Crj:CD) ラットの雌雄 (各13匹/群) に交配前 2 週間および交配期間 2 週間を通して経口投与し、さらに雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育 3 日まで投与を継続して親動物に対する反復投与毒性およびその生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

I. 反復投与毒性 (親動物所見)

1) 一般状態

雌雄ともに、いずれの投与群においても死亡例は無く、また、毒性変化とみなされる一般状態の異常も認められなかった。

2) 体重および摂餌量

雌雄ともに、体重、区間体重増加量および摂餌量のいずれにも対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

3) 解剖時検査所見

A. 雄〔解剖日：投与期間 (42回投与) 終了翌日〕

a) 血液学的検査所見

300 mg/kg 以上の投与群において平均赤血球血色素量の有意な減少がみられた。しかし、赤血球数、血色素濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素濃度および血小板数には、この変化に対応する変化がみられなかったことから偶発的な所見と判断した。このほか白血球数が、300 mg/kg 以上の投与群において用量依存的な減少傾向を示したが、有意差は認められなかった。白血球分類の結果についても被験物質の影響を示唆する変化は認められなかった。

b) 血液生化学的検査所見

300 mg/kg 投与群において無機リンおよびカルシウム濃度の有意な減少、1000 mg/kg 投与群において総コレステロール、無機リン、カルシウム、カリウム濃度の有意な減少および塩素濃度、GOT活性の有意な上昇がみられた。他の検査項目については、被験物質の投与に起因したと推定される変化は認められなかった。

c) 器官重量 (胸腺、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体)

1000 mg/kg 投与群において、腎臓の比体重値が有意な高値を示したほかには、被験物質の投与に起因したと推定される変化は認められなかった。

d) 剖検所見

いずれの組織・器官にも被験物質との関連が推定される肉眼的変化は認められなかった。

e) 病理組織学的検査所見

腎皮質・近位尿細管曲部における再生尿細管の増加が、300 mg/kg 投与群の3例および1000 mg/kg 投与群の12例にみられ、その程度も1000 mg/kg 投与群において増大する傾向を示した。他の組織・器官については、被験物質との関連が推定される特徴的な異常所見は認められなかった。

B. 雌〔解剖日：哺育4日、全児死亡日、妊娠25日相当日（全胚吸収および不妊例）〕

a) 器官重量 (胸腺、肝臓、腎臓)

胸腺の実重量および比体重値の有意な減少が100 mg/kg 投与群において、実重量の有意な減少が1000 mg/kg 投与群においてそれぞれみられた。他の器官重量には、いずれにも対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

b) 剖検所見

胸腺の退縮が、100 mg/kg 投与群の2例および1000 mg/kg 投与群の5例にみられたほか、腎皮髄境界部の淡色あるいは白濁が、100 および 1000 mg/kg 投与群の各1例に、腎皮質の淡色が1000 mg/kg 投与群の1例に認められた。

c) 病理組織学的検査所見

腎皮質・近位尿細管曲部における再生尿細管の増加とともに、多数の空胞を有し泡沫状に膨化した尿細管上皮細胞および尿細管上皮細胞の壊死が、100 mg/kg 以上の投与群においてみられ、その頻度および程度は用量依存的に増大する傾向を示した。このほか胸腺の退縮を示す例が、1000 mg/kg 投与群において増加した。他の組織・器官については、被験物質との関連が推定される特徴的な異常所見は認められなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖学的検査所見

1) 交配成績

被験物質の投与との関連が疑われる異常所見は、いずれの投与群においても認められな

かった。

2) 分娩および哺育状態

被験物質の投与との関連が疑われる異常所見は、いずれの投与群においても認められなかった。

3) 黄体数、着床数および着床率

妊娠雌の黄体数、着床数および着床率に対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

4) 出産率および妊娠期間

出産率および妊娠期間ともに対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

2. 出生児所見

1) 生存性

児の産出率 $[(\text{産児数} / \text{着床痕数}) \times 100]$ 、出生率 $[(\text{出生児数} / \text{着床痕数}) \times 100]$ 、哺育0日および4日の生存率に対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 体重

いずれの測定時期においても出生児の体重に対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

3) 形態

哺育0日の外表観察、死亡児および哺育4日における全出生児の剖検において被験物質の投与に起因したと推定される外表および内臓の異常は認められなかった。

Ⅲ. 評価

以上のごとく DCR7 は、雄では 300 mg/kg、雌では 100 mg/kg 以上のほぼ6週間にわたる反復投与によって、主として雌雄ラットの腎に器質的変化を来し、雄ではこの変化に起因するとみられる血液生化学的検査値の変動も認められた。しかし、1000 mg/kg の投与によっても全身毒性を示唆する毒性変化は発現せず、生殖発生毒性学的な影響はなら認められなかった。これらのことから本試験条件下では、DCR7 の反復投与毒性に関する無影響量は、雄では 100 mg/kg/day、雌では 100 mg/kg/day 未満であり、ま

た、生殖発生毒性に関するそれは、雌雄ともに 1000 mg/kg/day と推察される。

緒 言

OECD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として D & C Red 7 の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（以下、併合試験）を行い、同化合物の雌雄ラットに及ぼす反復投与毒性ならびに生殖・発生毒性について検討したのでその結果を報告する。

D & C Red 7〔3-ヒドロキシ-4-[(4-メチル-2-スルホフェニル)アゾ]-2-ナフタレンカルボン酸のカルシウム塩、別名：Pigment Red 57:1, C.I. 15850, Lithol Rubine BCA〕は、同一化合物の二ナトリウム塩である D & C Red 6 とともに、米国 F D A によって 2 年間の慢性毒性試験、多世代繁殖試験、催奇形性試験等の毒性試験データが検討され、着色剤として医薬品および化粧品（眼周囲へ使用する製品を除く）への使用が承認されている化合物である。本化合物については、ラットへの経口投与による LD₅₀ 値が 5000 mg/kg 以上であり¹⁾、ラットおよびマウスに対する癌原性はみられないこと²⁾など比較的に低毒性であることが報告されているが、一方ではラットの多世代繁殖試験において 50 mg/kg/day の投与で第 2 世代の繁殖性が低下したこと³⁾、1000 mg/kg の 22 回反復経口投与（間歇投与・5 回/週）で軽度の体重増加抑制、腎臓重量の増加、尿細管の病理組織学的変化がラットにみられること³⁾なども報告されている。特に、慢性的な経口摂取によってラットの腎臓に病理組織学的変化（chronic progressive nephrosis の増悪）がみられることは、D & C Red 6 についても報告されており²⁾、本化合物には腎臓を標的器官とする毒性が推定される。

試験材料および方法

1. 被験物質

D & C Red 7 (ロット番号、 ; CAS No. 5281-04-9; 別名、C.I. Pigment Red 57-1; 以下 DCR7) は、分子量: 442.4 (結晶水 1 分子を含む)、純度: 約 98% (wt%)、不純物として NaCl, H₂O, CaCl₂, Ca(OH)₂ を含み、水、アセトンにほとんど不溶の赤色の粉末である (Annex 1)。本被験物質は、使用時まで室温・遮光条件下で密封保管し、5% アラビアゴム 水溶液 (アラビアゴム: ロット番号、JD03 (宮澤薬品); 注射用蒸留水: ロット番号、L05019 (山口製薬)) に懸濁して、いずれの用量においても 1 回の投与液量が 10 ml/kg になるように含量を調整し、投与検体とした。調製した投与検体は、冷暗条件下で密封保管し、調製後 7 日以内に投与した。調製液中の被験物質は、室温・遮光の保管条件下で少なくとも 7 日間安定であり、均一性も保持されることを確認した (Annex 2)。また、使用した投与検体には、ほぼ所定量の DCR7 が含有されていたことを確認した (Annex 3)。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも 7 週齢にて購入した日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産の Sprague-Dawley 系ラット (Crj:CD, SPF) を使用した (Annex 4)。購入した動物は、入荷後 1 週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、一般状態に異常が認められなかったものを試験に供した (体重範囲 (群分け時): 雌 196.5~227.4g、雄 253.5~299.6g)。

各動物は、温度 24±1℃、相対湿度 55±5%、換気回数約 15 回/時間、照明 12 時間 (午前 7 時~午後 7 時) に調節されたバリアーシステムの飼育室で、金属製金網床ケージ (22×27×19cm、日本ケージ(株)) に個別に収容して飼育し、固型飼料 (CA-1、日本クレア(株)) および水道水を自由に摂取させた。妊娠 18 日以後の母動物には、飼育ケージの床に金属製床板を敷き、床敷として木製チップ (ホワイティフレーク®、日本チャールス・リバー(株)) を適宜供給した。

供給した飼料、水、および床敷には試験に支障を来す可能性の考えられる夾雑物の混在はなかった。

3. 群分け法

雌雄とも初回投与日の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けし、1群につき各13匹を用意した。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

DCR7 の投与量は、次項に示す予備試験の結果を参考に 100、300 および 1000 mg/kg とした。投与液量は、各用量とも 10 ml/kg とし、対照群のラットには、懸濁用媒体である 5 % アラビアゴム 水溶液を DCR7 投与群と同一条件にて投与した。以下に群構成を示す。

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与液量 (ml/kg)	匹数 (動物番号)	
				雄	雌
1	溶媒対照 ^a	0	10	13 (MX01001-013)	13 (FB01001-013)
2	DCR7	100	10	13 (MX02001-013)	13 (FB02001-013)
3	DCR7	300	10	13 (MX03001-013)	13 (FB03001-013)
4	DCR7	1000	10	13 (MX04001-013)	13 (FB04001-013)

a: 5 % アラビアゴム 水溶液

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後14日間の連続42日間、また、雌に対しては交配前14日間と交配期間中（交尾成立まで；最長14日間）ならびに交尾成立雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日まで毎日1回、ラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。毎日の投与は、原則として一定時刻の間（通常13時～16時）に行い、各動物の投与液量は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重をもとに、また、交尾成立後の雌については妊娠0日の体重をもとにそれぞれ算出した。

5. 予備試験（投与量の設定）

DCR7 の 0（溶媒対照）および 1000 mg/kg を Sprague-Dawley 系 (Crj:CD) ラットの雌雄各 5 匹に 1 日 1 回、14 日間、反復して経口投与し、投与終了日の翌日に剖検して DCR7 の雌雄ラットに対する反復投与毒性について検討した。投与期間中は、生死、一般状態を毎日観察し、体重を投与 1（投与開始日）、7 および 14 日に測定した。摂餌量については、投与 1～7 日および 7～14 日の各期間における総摂取量を求めた。剖検時には、体重、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、卵巣および精巣の重量を測定した。これらの器官は、10

%ホルマリンに固定して保存し、腎臓の病理組織学的検査を雌雄全例について行った。試験材料および方法は、併合試験法に準じた。なお、DCR7 の用量は、併合試験法ガイドラインに示された限度試験の用量が 1000 mg/kg であることを考慮し、また、Leist (1982) による本被験物質の亜急性毒性試験³⁾の結果を参考にして設定した。この試験では DCR7 の LD₅₀値が 5000 mg/kg 以上であることを根拠に、単一用量として設定された 1000 mg/kg の22回反復経口投与（間歇投与・5回/週）でラットに軽度の体重増加抑制、腎臓重量の増加、尿細管の病理組織学的変化がみられたことが報告されている。

試験結果は、次のように要約される。

1) 一般状態

死亡例は、雌雄ともに認められなかった。一般状態に関しても 1000 mg/kg 投与群の雌雄で被験物質様の赤色調を呈する便が、投与開始後、連日みられたほかに変化は認められなかった。

2) 体重および摂餌量 (Tables P1~P6, Appendixes P1-1~P6-2)

雌雄ともに、体重、体重増加量、摂餌量のいずれにも対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

3) 器官重量 (Tables P7, P8, Appendixes P7-1~P8-2)

雌雄ともに、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、卵巣、精巣の実重量および比体重値のいずれにも対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

4) 剖検所見 (Table P9, Appendix P9)

雌雄ともに被験物質投与群では前胃粘膜および腸内容物が被験物質様の赤色調を呈していたが、被験物質の毒性的影響を示唆する明らかな変化はなかった。

5) 腎臓の病理組織学的検査所見 (Table P10, Appendix P10)

1000 mg/kg 投与群の雄 5 例中 3 例において皮質の尿細管上皮細胞の変性あるいは壊死が認められた。これらの例では変性した尿細管の腔が拡張しており、また最も強い変化を示した 1 例の髓質では、一部の集合管の腔内に細胞変性物と思われるエオジン淡染物が含まれていた。他の 1 例では尿細管上皮の変性はみられなかったが、尿細管腔のごく軽度な拡張が認められた。被験物質投与群の雌では、1 例に尿細管上皮のごく軽度な変性がみられたにすぎなかった。このほか、ごく少数の再生尿細管が、対照群、被験物質投与群の雌雄にみられた。

6) 併合試験における投与量

以上から DCR7 の 1000 mg/kg は、14日間の反復経口投与によって顕著な全身毒性は示さないものの雄ラットにおいて腎臓に病理組織学的変化を惹起することが確認された。この毒性変化には、性差のあることが示唆されたが、併合試験では、より長期間の投与で雌ラットに対する影響がみられるか否かの検討を含め、DCR7 のより明確な毒性を検索する目的で、最高用量を 1000 mg/kg/day とし、以下を公比約 3 で除して中間用量を 300 mg/kg/day、最低用量を 100 mg/kg/day に設定した。

6. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

B. 体重

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週 1 回〔雄：投与 0、7、14、21、28、35、42日、雌：投与 0、7、14、21日〕および解剖日に測定した。また、交尾成立雌では、妊娠 0、7、14、20日、分娩した雌では、分娩後 0 および 4 日（哺育 0 および 4 日）の体重を測定した。

C. 摂餌量

雌雄とも、全例について体重測定日と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算定した。交配期間中の摂餌量は測定しなかった。交尾成立雌では、妊娠 0-7、7-14、14-20日および分娩した雌では、哺育 0-4日の摂餌量を測定した。

D. 交配

交配は、投与14日（15回投与日）の夕方から最長 2 週間、同一群内の雌雄を 1 対 1 で同居させて行った。交尾成立の確認は、毎朝、腔内の腔栓および腔垢中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠 0 日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率〔（交尾動物数／同居動物数）× 100〕、受胎率〔（妊娠動物数／交尾動物数）× 100〕および同居開始日から交尾確認

日までの日数を求めた。

E. 分娩状態

各群とも交尾成立雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の直接観察は、可能なものについて行った。ただし、直接観察できなかった個体についても、分娩後の徴候から分娩困難や分娩遅延などの分娩障害の有無を判断し、個別に記録した。

F. 分娩日の算定

分娩の確認は、午前9時～11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体について、その日を哺育0日、その前日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩した個体については、翌日を哺育0日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間（妊娠0日～分娩日の日数）を算定し、出産率 $[(\text{生児出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100]$ を各群について求めた。

G. 病理学的検査

a) 雄動物

i. 剖検、器官重量および病理組織学的検査

最終投与日の翌日〔投与42日相当日（投与開始日＝投与0日）〕にペントバルビタール深麻酔下で放血・致死させて剖検した。その際、全例について胸腺、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、これらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎および剖検において異常を認めた器官は10%ホルマリンに、精巣および精巣上体は、ブアン液に固定して保存し、1000 mg/kg 投与群および対照群の全例について病理組織学的検査を行った。なお、腎臓の病理組織学的検査は、300 および 100 mg/kg 投与群についても行った（結果の項参照）。

ii. 血液学的検査

全例について、剖検に先立ち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈より EDTA を抗凝固剤として採血し、以下の項目について検査した。

項	目	測 定 法	使 用 機 器
赤血球数 (RBC)		自動 (電気抵抗法)	Coulter Counter Model S-PLUS IV (エレクトロニクス社)
白血球数 (WBC)		" (")	"
血色素濃度 (Hb)		" (吸光度法)	"
平均赤血球容積 (MCV)		" (電気抵抗法)	"
ヘマトクリット値 (Ht)		" ($0.001 \times \text{RBC} \times \text{MCV}$)	"
平均赤血球血色素量		" ($1000 \times \text{Hb} / \text{RBC}$)	"
平均赤血球血色素濃度		" ($100 \times \text{Hb} / \text{Ht}$)	"
血小板数		" (電気抵抗法)	"
白血球分類		視算 (静脈血塗抹標本, Wright-Giemsa 染色)	光学顕微鏡

ハ. 血液生化学的検査

全例について、血液学的検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として用いて採血し、それぞれ血漿を分離して次の項目について検査を行った。

項	目	測 定 法	使 用 機 器
総蛋白濃度		ビウレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS- FARA (ロシュ)
アルブミン濃度		B C G 法	"
総コレステロール濃度		C O D ・ D A O S 法	"
ブドウ糖濃度		グルコキナーゼ・G6PDH 法	"
尿素窒素濃度		ウレアーゼ・G L D H 法	"
クレアチニン濃度		Jaffe 法	"
アルカリフォスファターゼ活性		p-ニトロフェニル/酸基質法	"
G O T 活性		S S C C 法	"
G P T 活性		S S C C 法	"
総ビリルビン濃度		ビリルビン/ピコサリット S シリーズ	"
カルシウム濃度		O C P C 法	"
ナトリウム濃度		イオン電極法	Na-K-Cl アナライザー IT-3型 (常光)
カリウム濃度		イオン電極法	"
塩素濃度		電量滴定法	"
無機リン濃度		モリブデン酸直接法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS- FARA (ロシュ)
γ -G T P 活性		γ -グルタミル - p - ニトロニリド 基質法	"
A / G 比		計算	—

b) 雌動物

1. 剖検、器官重量および病理組織学的検査

分娩した雌は哺育4日に、また、交尾したが分娩しない雌は妊娠25日相当日にそれぞれエーテル深麻酔下で放血・致死させ、剖検した。妊・不妊のいずれの例においても卵巣および子宮を摘出し、子宮については Salewski 法⁵⁾を応用して着床痕を染色して着床数を確認した。卵巣はブアン液に固定して保存し、実体顕微鏡下で黄体数を数えた。不妊例の

卵巣については、病理組織学的検査を行った。また、胸腺、肝臓および腎臓の重量を全例について測定した。これらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、子宮および剖検において異常を認めた器官は10%ホルマリンに固定して保存し、1000 mg/kg 投与群および対照群の全例について病理組織学的検査を行った。なお、腎臓の病理組織学的検査は、300 および 100 mg/kg 投与群についても行った（結果の項参照）。

2) 出生児

A. 産児数の算定

哺育0日に産児数（生存児＋死亡児）を調べ、児の産出率〔（産児数／着床痕数）× 100〕および出生率〔（出産児数／着床痕数）× 100〕を求めた。産児の性別を調べ、外表異常の有無を観察した。

B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、哺育0日の生存率〔（生児数／産児数）× 100〕および哺育4日の生存率〔（哺育4日の生児数／哺育1日の生児数）× 100〕を求めた。死亡児は剖検し、胸腔および腹腔内の器官を除去した後、エタノールに固定して保存した。

C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重（litter 重量）を測定し、〔litter 重量／測定児数〕を各腹について求めた。

D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル深麻酔下で致死させ、剖検した。胸腔および腹腔内の器官は、一括して摘出し、各腹ごとに10%ホルマリンに固定して保存した。カーカスは、各腹ごとにエタノールに固定して保存した。

7. 動物の個体識別法

試験に使用した動物には、F₁出生児を除き、すべて尾にフェルトペンで群および個体番号を記して個体識別した。各飼育ケージには、個体番号等の必要事項を記入した、群ごとに色彩の異なるカードを掛けて個体識別の補助とした。F₁出生児は、個体を識別しなかった。

8. 統計処理

交尾率および受胎率については χ^2 検定を行った。その他のすべてのデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を1 標本として、先ず、Bartlett 法により各群の分散の一樣性について検定した。その結果、分散が一樣とされた場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合には Dunnett 法あるいは Scheffé 法により対照群と各被験物質投与群との間で平均値の差の検定を行った。分散が一樣でなかった場合は、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性が認められた場合に対照群と各被験物質投与群との差について Dunnett 型あるいは Scheffé 型の検定を行った。

有意水準は、5 %および1 %とした。

I. 反復投与毒性（親動物所見）

1) 途中死亡例

死亡例は、雌雄ともにいずれの投与群においても認められなかった。

2) 一般状態（Tables 1, 2; Appendixes 1-1～2-4）

各 DCR7 投与群の雌雄では、投与した被験物質と同様の色調を呈する赤色の糞が、投与期間中、連日観察された。このほか、ごく少数の動物に痂皮の形成がみられたが、毒性変化とみなされる一般状態の異常は、雌雄ともにいずれの投与群においても認められなかった。

3) 体重

A. 雄（Tables 3, 4; Appendixes 3-1～4-4）

体重、区間増加量ともにいずれの被験物質投与群においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

B. 雌

(1) 交配開始前（Tables 5, 6; Appendixes 5-1～6-4）

体重、区間増加量ともにいずれの被験物質投与群においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

(2) 妊娠期間中（Tables 7, 8; Appendixes 7-1～8-4）

体重、区間増加量ともにいずれの被験物質投与群においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

(3) 分娩後（Tables 9, 10; Appendixes 9-1～10-4）

体重、区間増加量ともにいずれの被験物質投与群においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

4) 摂餌量

A. 雄 (Table 11; Appendixes 11-1~11-4)

いずれの被験物質投与群においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

B. 雌

(1) 交配前 (Table 12; Appendixes 12-1~12-4)

いずれの被験物質投与群においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

(2) 妊娠期間中 (Table 13; Appendixes 13-1~13-4)

いずれの被験物質投与群においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

(3) 分娩後 (Table 14; Appendixes 14-1~14-4)

いずれの被験物質投与群においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

5) 解剖時検査所見

A. 雄〔解剖日：投与期間（42回投与）終了翌日〕

(1) 血液学的検査所見 (Table 15; Appendixes 15-1~15-4)

300 mg/kg 以上の投与群において平均赤血球血色素量が有意 ($p < 0.05$) に減少した。しかし、赤血球数、血色素濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素濃度および血小板数には、なんらの変化も認められなかった。白血球数については、300 mg/kg 以上の投与群において用量依存的な減少傾向がみられたが、対照群との間に有意差は認められなかった。白血球分類の結果についても被験物質の影響を示唆する変化は認められなかった。

(2) 血液生化学的検査所見 (Table 16; Appendixes 16-1~16-4)

300 mg/kg 以上の投与群において無機リンおよびカルシウム濃度の有意な減少、さらに1000 mg/kg 投与群において総コレステロール、カリウム濃度の有意な減少および塩素濃度、GOT活性の有意な上昇がみられた。このほかの検査項目には、被験物質の投与に起因したと推定される変化は認められなかった。

(3) 剖検所見 (Table 17; Appendixes 17-1~17-4)

いずれの組織・器官にも被験物質との関連が推定される肉眼的変化は認められなかった。

(4) 器官重量 (Table 19; Appendixes 19-1~19-4)

胸腺、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体の重量を測定した結果、1000 mg/kg 投与群にお

いて腎臓の比体重値が有意 ($p<0.01$) な高値を示した。このほかには被験物質の投与に起因したと推定される変化は認められなかった。

(5) 病理組織学的検査所見 (Table 22; Appendixes 22-1~22-4)

対照群および 1000 mg/kg 投与群の 2 実験群について指定組織・器官の病理組織学的検査を実施したところ 1000 mg/kg 投与群の雌雄では、腎臓に器質的变化が生じていることが明らかとなった (後述)。このため、腎臓についての病理組織学的検査は、100 および 300 mg/kg 投与群についても拡張して実施した。

各器官における観察所見の概要を以下に示す。

(脳)

いずれの群にも変化はみられなかった。

(胸腺)

出血が、対照群の 1 例および 1000 mg/kg 投与群の 2 例にみられたほかに変化はなかった。

(心臓)

ごく小領域の心筋変性が、対照群の 2 例にみられたほかに変化はなかった。

(肝臓)

小肉芽腫、小葉周辺部肝細胞の脂肪変性が、対照群および 1000 mg/kg 投与群の両群にみられたが、頻度および程度に明らかな差はなかった。このほかには、ごく軽度の巣状壊死が、1000 mg/kg 投与群の 1 例にみられたのみであった。

(腎臓)

300 mg/kg 投与群の 3 例および 1000 mg/kg 投与群の 12 例では、皮質に対照群と比較して明らかに数を増した多数の再生尿細管が認められ、その程度は、1000 mg/kg 投与群において増強する傾向を示した (Photo 1, 2)。それらの再生尿細管は、主として近位尿細管曲部に多くみられ、細胞密度は高く、その核はやや大型であり、細胞質は淡明あるいは好塩基性であったほか、多くの例で腔内にやや黄色調を呈する物質が含まれていた。100 mg/kg 投与群では、尿円柱が 1 例にみられた。このほか、eosinophilic body が各投与群に散見されたが、頻度および程度に差はなかった。

(副腎)

皮質における褐色色素の沈着が、対照群および 1000 mg/kg 投与群の両群にみられたが、頻度および程度に明らかな差はなかった。

(脾臓)

褐色色素の沈着および髄外造血が、対照群および 1000 mg/kg 投与群の両群にみられたが、頻度および程度に明らかな差はなかった。

(精巣)

精細管の萎縮が、対照群の 2 例および 1000 mg/kg 投与群の 3 例にみられた。このうち 1000 mg/kg 投与群の 1 例では萎縮した精細管に石灰の沈着が認められた。

(精巣上体)

精巣の萎縮がみられた対照群の 1 例 (MX01006) および 1000 mg/kg 投与群の 1 例 (MX04010) において管腔内の精子の減少がみられたほかに変化はみられなかった。

B. 雌〔解剖日：哺育 4 日、全児死亡日、妊娠 25 日相当日 (全胚吸収および不妊例)〕

(1) 剖検所見 (Tables 18-1~18-6; Appendixes 18-1~18-4)

雌全例の所見を Table 18-1 に、各経過別に分けた所見を Table 18-2~18-6 に示した。

胸腺の退縮が、100 mg/kg 投与群の 2 例および 1000 mg/kg 投与群の 5 例にみられたほか、腎皮髄境界部の淡色あるいは白濁が、100 および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例、腎皮質の淡色が 1000 mg/kg 投与群の 1 例に認められた。このほかには被験物質との関連が推定される肉眼的変化は認められなかった。

(2) 器官重量

a) 哺育 4 日解剖例 (Table 20; Appendixes 20-1~20-4)

胸腺、肝臓、腎臓の重量を測定した結果、胸腺の実重量および比体重値が 100 mg/kg 投与群において、実重量が 1000 mg/kg 投与群において有意 ($p < 0.05$, 0.01) な低値を示した。肝臓および腎臓の重量には、対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

b) 不妊例、全児死亡例、全胚吸収例、除外例 (Table 21)

100 mg/kg 投与群の全児死亡例 1 例において胸腺重量が低値であったほかには、著しい変化は認められなかった。

(3) 病理組織学的所見 (Tables 23-1~23-6; Appendixes 23-1~23-4)

雌全例の所見を Table 23-1 に、各経過別に分けた所見を Table 23-2~23-6 に示した。

各器官における観察所見の概要を以下に示す。

(脳)

いずれの群にも変化はみられなかった。

(胸腺)

対照群では2例にごく軽度～軽度の退縮がみられた。これに比して 1000 mg/kg 投与群では胸腺の退縮を示す例が増加し、1例にごく軽度、3例に軽度、2例に中等度の退縮がみられた。

(心臓)

いずれの群にも変化はみられなかった。

(肝臓)

小肉芽腫、小葉周辺部肝細胞の脂肪変性が、対照群および 1000 mg/kg 投与群の両群にみられたが、頻度および程度に明らかな差はなかった。

(腎臓)

各被験物質投与群では、再生尿細管の増加に加えて、主として近位尿細管曲部に多数の空胞を有し、泡沫状に膨化した尿細管上皮細胞がみられ、その頻度および程度は用量依存的に増強する傾向を示した (Photo 3, 4)。また、同部位には各被験物質投与群ともに尿細管上皮細胞の壊死もみられ、好酸性を呈する壊死上皮細胞や黄色調を呈する物質が尿細管腔に含まれる例が多かった。このような病像を呈する尿細管の基底部には、やや大型で好塩基性の細胞質を有する再生上皮細胞が多く認められた。しかし、未分娩であった 100 mg/kg 投与群の1例、不妊であった 300 mg/kg 投与群の2例および未交尾であった 1000 mg/kg 投与群の1例では、これらの変化はみられないか、または微弱な変化として観察されたにすぎなかった。このほか、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各1例に尿円柱がみられ、対照群の1例は慢性腎症のごく軽度の変化と思われたほか、対照群および 100 mg/kg 投与群の各1例において近位尿細管上皮に微細な空胞がみられ、100 および 1000 mg/kg 投与群の各1例に限局性の尿細管拡張がみられたが、いずれも被験物質投与との関連は明らかではなかった。

(副腎)

1000 mg/kg 投与群において、皮質におけるごく軽度の褐色色素の沈着が1例および両側皮質における小壊死巣が1例にみられたほかに変化はなかった。

(脾臓)

褐色色素の沈着および髄外造血が、対照群および 1000 mg/kg 投与群の両群にみられたが、頻度および程度に明らかな差はなかった。

(卵巣)

不妊であった対照群の 2 例および 300 mg/kg 投与群の 2 例ならびに未交尾であった 1000 mg/kg 投与群の 1 例のいずれにも異常所見はなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖学的検査所見

1) 交配成績 (Table 24; Appendixes 24-1~24-4)

交尾率および受胎率に対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。また、同居開始から交尾確認日までの日数および交尾成立までの回帰発情回数についても対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 分娩および哺育状態

被験物質の投与に起因したと推定される分娩状態あるいは哺育状態の異常はいずれの投与群においても認められなかった。

3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 25; Appendixes 25-1~25-4)

妊娠雌の黄体数、着床数および着床率に対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

4) 出産率および妊娠期間 (Table 25; Appendixes 25-1~25-4)

出産率および妊娠期間ともに対照群と各被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

2. 出生児所見

1) 生存性 (Table 25; Appendixes 25-1~25-4)

児の産出率 $[(\text{産児数} / \text{着床痕数}) \times 100]$ 、出生率 $[(\text{出生児数} / \text{着床痕数}) \times 100]$ 、哺育 0 日および哺育 4 日の生存率に対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 体重 (Table 26; Appendixes 26-1~26-4)

いずれの測定時期においても出生児体重に対照群と被験物質投与群との間で有意差は認

められなかった。

3) 形態 (Tables 27, 28)

100 mg/kg 投与群の生児 1 例 (哺育 4 日剖検) に左臍帯動脈遺残がみられたほかには、
いずれの出生児においても外表および内臓の異常は認められなかった。

考 察

以上のごとく DCR7 は、雄では 300 mg/kg 以上、雌では 100 mg/kg 以上の約 6 週間にわたる反復投与により、雌雄ラットに腎臓の器質的変化を主とする毒性変化をもたらした。観察された腎の病変は、雄で再生尿細管の増加、雌で尿細管上皮細胞の変性・壊死であり、雌雄で相違がみられたが、1000 mg/kg の 2 週間反復投与による予備試験では、雄において尿細管上皮細胞の変性・壊死がみられ、雌ではほぼ無変化であったことから推測すると、雄では、雌に比較してより早期に尿細管上皮細胞の変性・壊死が発現した可能性が考えられる。すなわち、雄の病像は、変性・壊死した尿細管上皮の回復像と推定される。しかし、雄の血液生化学的検査においては無機リン、カルシウム等の血漿無機質が、300 mg/kg 以上の投与群で変動しており、このような回復期の病像を示すと推定される腎臓においてもその機能には異常が随伴した可能性も示唆された。本被験物質はアゾ色素であり、その化学構造のなかに 4-methyl-2-sulphophenyl 構造を含むが、アゾ色素の生体内分解産物から発見・開発された経緯をもつスルフォンアミド類—いわゆるサルファ剤についてはラットに及ぼす毒性として甲状腺肥大作用の他に腎障害を誘起する作用が知られている⁴⁾。また、サルファ剤の大量投与では、甲状腺ホルモン分泌抑制に起因して肝のコレステロール代謝が抑制されるとされるが、本試験では、1000 mg/kg 投与群において血中コレステロール値の変動も認められている。したがって DCR7 の投与に起因したと考えられる上記の生化学的あるいは病理学的変化は、生体内で分解・吸収された本被験物質の分解産物またはその代謝体に原因を求めることができるかもしれない。しかし、DCR7 は、腎臓の器質的変化を主とする毒性変化のほかには、1000 mg/kg の投与によっても重度の全身毒性を示さず、生殖発生毒性学的な影響はまったく示さなかった。これらのことから本試験条件下では DCR7 の反復投与毒性に関する無影響量は、雄では 100 mg/kg/day、雌では 100 mg/kg/day 未満であり、また、生殖発生毒性に関するそれは、雌雄ともに 1000 mg/kg/day と判断される。

文 献

- 1) Patton, T.C. : "Pigment Handbook", Vol. I., 2nd ed. p496 (1973)
- 2) Food and Drug Administration, U.S. : "Federal Register", Vol. 47, 249: 57681-57692 (1982)
- 3) Leist, K.H. : Subacute toxicity studies of selected organic colorants. Ecotoxicology and Environmental Safety 6: 457-463 (1982)
- 4) 福田英臣, 秋元 健, 坂口 孝 : 毒性試験講座, 15巻, "医薬品" P29-35, 地人書館, 東京 (1990)

Table P1

Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

Body weight of males in the treatment period (g); Mean $\pm$ S.D.(N)

compound	Vehicle control	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	1000
Treatment Day		
1	300.1 $\pm$ 4.9 (5)	299.7 $\pm$ 3.8 (5)
7	332.5 $\pm$ 13.1 (5)	335.4 $\pm$ 5.5 (5)
14	373.6 $\pm$ 17.7 (5)	374.0 $\pm$ 7.7 (5)

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table P2

Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

Body weight gain data of males in the treatment period (g); Mean $\pm$ S.D.(N)

compound	Vehicle control	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	1000
Treatment Day		
1~ 7	32.4 $\pm$ 9.8 (5)	35.8 $\pm$ 2.4 (5)
7~ 14	41.1 $\pm$ 7.6 (5)	38.6 $\pm$ 5.8 (5)

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table P3

Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

Body weight of females in the treatment period (g); Mean $\pm$ S.D.(N)

compound	Vehicle control	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	1000
Treatment Day		
1	210.6 $\pm$ 3.1 (5)	210.4 $\pm$ 3.5 (5)
7	229.8 $\pm$ 8.5 (5)	229.4 $\pm$ 5.8 (5)
14	252.2 $\pm$ 11.3 (5)	243.3 $\pm$ 9.3 (5)

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table P4

Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

Body weight gain data of females in the treatment period (g); Mean $\pm$ S.D.(N)

compound	Vehicle control	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	1000
Treatment Day		
1~ 7	19.2 $\pm$ 5.8 (5)	19.0 $\pm$ 2.8 (5)
7~ 14	22.4 $\pm$ 4.9 (5)	13.9 $\pm$ 9.6 (5)

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table P5

Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

Food consumption of males in the treatment period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

compound	Vehicle control	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	1000
Treatment Day		
1~ 7	172.0 $\pm$ 13.9 (5)	175.6 $\pm$ 7.0 (5)
7~ 14	209.3 $\pm$ 18.8 (5)	200.9 $\pm$ 5.4 (5)

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table P6

Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

Food consumption of females in the treatment period (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

compound	Vehicle control	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	1000
Treatment Day		
1~ 7	128.0 $\pm$ 5.9 (5)	128.2 $\pm$ 8.6 (5)
7~ 14	155.6 $\pm$ 6.2 (5)	144.6 $\pm$ 13.4 (5)

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table P7

Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

Absolute and relative organ weight of males; Mean $\pm$ S.D. (N)

compound		Vehicle control		D & C Red 7	
Dose groups (mg/kg)		0		1000	
Final body weight	(g)	343.8 $\pm$ 16.4	(5)	340.7 $\pm$ 8.4	(5)
Thymus	(mg)	467.7 $\pm$ 74.1 ^{a)} 136.6 $\pm$ 25.0 ^{b)}	(5)	509.7 $\pm$ 57.3 149.7 $\pm$ 17.0	(5)
Liver	(g)	10.47 $\pm$ 0.78 3.04 $\pm$ 0.14	(5)	10.14 $\pm$ 0.83 2.98 $\pm$ 0.24	(5)
Kidneys	(g)	2.70 $\pm$ 0.24 0.79 $\pm$ 0.06	(5)	2.80 $\pm$ 0.39 0.82 $\pm$ 0.12	(5)
Adrenal glands	(mg)	52.9 $\pm$ 3.6 15.4 $\pm$ 0.5	(5)	53.4 $\pm$ 6.2 15.7 $\pm$ 2.1	(5)
Testes	(g)	2.86 $\pm$ 0.31 0.84 $\pm$ 0.13	(5)	2.86 $\pm$ 0.11 0.84 $\pm$ 0.02	(5)

a): Absolute weight

b): Relative weight

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table P8

Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

Absolute and relative organ weight of females; Mean $\pm$ S.D. (N)

compound		Vehicle control		D & C Red 7	
Dose groups (mg/kg)		0		1000	
Final body weight	(g)	227.3 $\pm$ 10.0	(5)	223.2 $\pm$ 8.5	(5)
Thymus	(mg)	475.4 $\pm$ 144.5 ^{a)}	(5)	391.0 $\pm$ 98.5	(5)
		207.7 $\pm$ 54.9 ^{b)}		174.7 $\pm$ 41.5	
Liver	(g)	6.55 $\pm$ 0.59	(5)	6.40 $\pm$ 0.29	(5)
		2.88 $\pm$ 0.18		2.87 $\pm$ 0.07	
Kidneys	(g)	1.66 $\pm$ 0.09	(5)	1.64 $\pm$ 0.11	(5)
		0.73 $\pm$ 0.05		0.73 $\pm$ 0.03	
Adrenal glands	(mg)	58.5 $\pm$ 8.7	(5)	59.8 $\pm$ 4.9	(5)
		25.8 $\pm$ 4.2		26.8 $\pm$ 2.3	
Ovaries	(mg)	85.7 $\pm$ 9.1	(5)	90.3 $\pm$ 16.8	(5)
		37.8 $\pm$ 4.5		40.7 $\pm$ 8.9	

a): Absolute weight

b): Relative weight

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table P9

Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

Summary of macroscopic findings in rats

Sex Group Grade	Male				Female			
	Control		1000 mg/kg		Control		1000 mg/kg	
	-	±	+	Total	-	±	+	Total
(Thymus)								
brown spot	4	0	1	5	5	0	0	5
involution	5	0	0	5	5	0	0	5
(Lungs)								
dark colored spot	5	0	0	5	4	0	1	5
(Liver)								
yellow spot	3	0	2	5	4	0	1	5
yellowish	5	0	0	5	5	0	0	5
(Forestomach)								
reddish mucous membrane	5	0	0	5	3	0	2	5
(Intestine)								
reddish content	5	0	0	5	5	0	0	5
(Kidneys)								
pale color	4	0	1	5	5	0	0	5

-: Negative; ±: Slight; +: Positive

Table P10

Dose range finding study for D & C Red 7 in rats

Summary of histopathological findings in rats

Sex Group Grade	Male						Female					
	Control (n=5)						1000 mg/kg (n=5)					
	-	±	+	++	+++	NE	-	±	+	++	+++	NE
(Kidneys)												
dilated lumen of cortical tubules	5	0	0	0	0		1	1	2	1	0	
degeneration/necrosis												
of tubular epithelium in cortex	5	0	0	0	0		2	0	2	1	0	
debris in the lumen												
of collecting ducts	5	0	0	0	0		4	0	1	0	0	
regenerated tubules in cortex	2	3	0	0	0		1	4	0	0	0	

-: Negative; ±: Very slight; +: Slight; ++: Moderate; +++: Severe

Table 1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Summary of clinical signs of F₀ males

Clinical signs	Dose groups (mg/kg)	Number of treated animals	Number of animals with clinical signs					
			Day of treatment					
			1- 7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42
Red stained feces	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	100	13	13	13	13	13	13	13
	300	13	13	13	13	13	13	13
	1000	13	13	13	13	13	13	13
Crust formation	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	100	13	1	1	1	1	1	1
	300	13	0	0	0	0	0	0
	1000	13	0	0	0	0	0	0

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table 2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Summary of clinical signs of F₀ females

Clinical signs	Dose groups (mg/kg)	Number of treated animals	Number of animals with clinical signs					
			Day of treatment					
			1- 7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-Sacrifice
Red stained feces	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	100	13	13	13	13	13	13	13
	300	13	13	13	13	13	13	13
	1000	13	13	13	13	13	12 ^{a)}	12
Crust formation	Vehicle control	13	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0
	300	13	0	0	0	0	0	0
	1000	13	0	0	0	1	1	1

Vehicle control: 5% Gum Arabic

a): One female sacrificed on day 28 of treatment (Not-copulated)

Table 3

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Body weight of F₀ males in the treatment period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds		Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)		0	100	300	1000
Treatment week					
0	(Init. wt.)	271.7 ± 9.7 (13)	271.7 ± 7.7 (13)	272.8 ± 11.1 (13)	272.5 ± 10.1 (13)
1		320.5 ± 13.3 (13)	318.6 ± 9.9 (13)	317.0 ± 16.4 (13)	318.0 ± 15.1 (13)
2		360.9 ± 20.9 (13)	350.9 ± 16.6 (13)	352.6 ± 26.7 (13)	352.1 ± 23.1 (13)
3		389.5 ± 25.8 (13)	380.8 ± 18.2 (13)	378.7 ± 33.9 (13)	374.0 ± 29.2 (13)
4		422.0 ± 29.2 (13)	409.1 ± 26.5 (13)	412.8 ± 38.0 (13)	404.0 ± 29.1 (13)
5		451.0 ± 31.6 (13)	438.2 ± 25.5 (13)	438.6 ± 41.1 (13)	431.0 ± 29.8 (13)
6		472.8 ± 34.5 (13)	458.9 ± 29.2 (13)	459.2 ± 44.9 (13)	447.4 ± 34.2 (13)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 4

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Body weight gain data of F₀ males in the treatment period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Treatment Week				
0~1	48.7 ± 9.6 (13)	46.9 ± 7.4 (13)	44.2 ± 7.7 (13)	45.6 ± 7.7 (13)
1~2	40.5 ± 9.1 (13)	32.2 ± 9.1 (13)	35.5 ± 12.5 (13)	34.0 ± 10.1 (13)
2~3	28.6 ± 7.1 (13)	29.9 ± 8.6 (13)	26.2 ± 10.7 (13)	21.9 ± 12.4 (13)
3~4	32.4 ± 5.7 (13)	28.3 ± 11.5 (13)	34.1 ± 7.2 (13)	30.0 ± 8.6 (13)
4~5	29.0 ± 4.0 (13)	29.2 ± 8.8 (13)	25.8 ± 8.7 (13)	27.0 ± 5.9 (13)
5~6	21.9 ± 6.4 (13)	20.7 ± 5.7 (13)	20.6 ± 5.2 (13)	16.4 ± 8.7 (13)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 5

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Body weight of F₀ females in the pre-mating period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Pre-mating Week				
0 (Init. wt.)	209.8 ± 7.9 (13)	209.8 ± 8.3 (13)	209.4 ± 7.6 (13)	209.1 ± 8.0 (13)
1	229.7 ± 10.9 (13)	226.8 ± 12.8 (13)	223.3 ± 9.2 (13)	227.5 ± 9.8 (13)
2	245.3 ± 14.3 (13)	243.5 ± 12.7 (13)	237.8 ± 10.7 (13)	242.6 ± 11.1 (13)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 6

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Body weight gain data of F₀ females in the pre-mating period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Pre-mating Week				
0~1	19.9 ± 4.7 (13)	17.0 ± 7.5 (13)	13.9 ± 3.7 (13)	18.3 ± 6.1 (13)
1~2	15.6 ± 5.6 (13)	16.7 ± 3.2 (13)	14.5 ± 6.0 (13)	15.2 ± 5.3 (13)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 7

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Body weight of F₀ females in the pregnant period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Pregnant Day				
0	251.9 ± 13.9 (11)	253.0 ± 17.5 (13)	247.1 ± 13.0 (11)	252.7 ± 13.3 (12)
7	290.5 ± 14.2 (11)	283.4 ± 31.0 (13)	279.9 ± 18.8 (11)	285.2 ± 14.2 (12)
14	325.8 ± 16.4 (11)	324.7 ± 27.7 (13)	317.4 ± 26.5 (11)	319.1 ± 15.8 (12)
20	389.5 ± 19.3 (11)	398.4 ± 42.8 (13)	379.1 ± 29.5 (11)	388.3 ± 27.2 (12)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 8

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Body weight gain data of F₀ females in the pregnant period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Pregnant Day				
0~7	38.6 ± 7.6 (11)	30.3 ± 21.9 (13)	32.8 ± 13.8 (11)	32.4 ± 6.8 (12)
7~14	35.3 ± 4.4 (11)	41.3 ± 11.3 (13)	37.5 ± 9.9 (11)	33.9 ± 5.7 (12)
14~20	63.7 ± 13.2 (11)	73.8 ± 19.5 (13)	61.7 ± 13.7 (11)	69.2 ± 16.4 (12)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 9

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Body weight of F₀ females in the lactation period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Post partum Day				
0	292.6 ± 26.9 (11)	278.8 ± 27.5 (12)	281.7 ± 19.7 (11)	279.1 ± 27.9 (12)
4	318.3 ± 15.8 (11)	301.2 ± 23.6 (11)	298.6 ± 30.4 (11)	300.7 ± 31.5 (12)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 10

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Body weight gain data of F₀ females in the lactation period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Post partum Day				
0~4	25.6 ± 18.1 (11)	24.7 ± 17.0 (11)	16.9 ± 22.2 (11)	21.6 ± 18.8 (12)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 11

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Food consumption of F₀ males in the treatment period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Treatment Week				
1	204.2 ± 13.4 (13)	201.6 ± 11.8 (13)	196.0 ± 12.0 (13)	195.1 ± 11.6 (13)
2	202.6 ± 17.8 (13)	193.5 ± 17.5 (13)	191.7 ± 17.0 (13)	187.7 ± 15.4 (13)
4	204.6 ± 20.4 (13)	197.4 ± 19.5 (12)	198.4 ± 23.4 (12)	191.1 ± 12.2 (12)
5	207.7 ± 19.6 (13)	202.0 ± 14.7 (13)	201.3 ± 21.2 (13)	194.4 ± 13.9 (13)
6	206.7 ± 23.1 (13)	202.2 ± 17.0 (13)	195.8 ± 19.6 (13)	189.0 ± 16.6 (13)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 12

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Food consumption of F₀ females in the pre-mating period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Pre-mating Week				
1	148.5 ± 10.2 (13)	143.7 ± 14.9 (13)	144.3 ± 10.9 (13)	143.3 ± 9.5 (13)
2	151.1 ± 16.7 (13)	146.1 ± 12.2 (13)	145.6 ± 13.3 (13)	147.0 ± 18.2 (13)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 13

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in ratsFood consumption of F₀ females in the pregnant period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Pregnant Day				
0~7	178.7 ± 19.4 (11)	170.2 ± 32.6 (13)	168.6 ± 27.8 (11)	167.4 ± 14.3 (12)
7~14	194.2 ± 19.5 (11)	194.7 ± 26.6 (13)	189.5 ± 36.8 (11)	181.6 ± 15.9 (12)
14~20	153.1 ± 12.5 (11)	160.8 ± 19.3 (13)	153.6 ± 9.1 (11)	156.5 ± 12.9 (12)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 14

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D. & C Red 7 in rats

Food consumption of F₀ females in the lactation period (g); Mean±S.D. (N)

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Post partum Day				
0~4	118.9 ± 29.2 (11)	105.6 ± 39.8 (11)	102.3 ± 35.8 (11)	112.7 ± 25.6 (12)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 15

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Summary of hematological findings of F₀ males; Mean $\pm$ S.D.

Sex	Dose groups (mg/kg)	Number of Animals	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)	WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	Differential count of WBC (%)						Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)
										Neutro.		Eos.	Baso.	Mono.	Lymph.	
										Band	Seg.					
Male	Control	13	838 ± 34	15.6 ± 0.7	43.6 ± 2.5	52 ± 1	18.6 ± 0.5	35.7 ± 0.9	133 ± 34	0 ± 0	9 ± 3	1 ± 1	0 ± 0	3 ± 2	87 ± 4	118.5 ± 11.8
	100	13	839 ± 32	15.4 ± 0.6	43.1 ± 1.9	51 ± 2	18.3 ± 0.4	35.8 ± 1.2	123 ± 26	0 ± 0	9 ± 4	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 2	88 ± 5	119.1 ± 13.9
	300	13	843 ± 25	15.1 ± 0.4	42.9 ± 1.1	51 ± 2	18.0* ± 0.5	35.3 ± 0.7	118 ± 49	0 ± 0	9 ± 5	1 ± 2	0 ± 0	1 ± 1	88 ± 4	121.7 ± 12.4
	1000	13	836 ± 31	15.0 ± 0.5	42.8 ± 1.5	51 ± 1	18.0* ± 0.5	35.1 ± 0.5	95 ± 29	0 ± 0	11 ± 3	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 2	86 ± 4	111.4 ± 9.1

* : Significantly different from control $p < 0.05$

Table 16

Combined repeat dose and reproductive / developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Summary of biochemical findings of F₀ males ; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compounds.	Vehicle control		D & C Red 7		D & C Red 7		D & C Red 7	
Dose groups (mg/kg)			100		300		1000	
Total protein ; g/dl	5.9 $\pm$ 0.3	(13)	5.8 $\pm$ 0.3	(13)	5.7 $\pm$ 0.3	(13)	5.8 $\pm$ 0.4	(13)
Albumin ; g/dl	3.1 $\pm$ 0.1	(13)	3.0 $\pm$ 0.3	(13)	3.1 $\pm$ 0.1	(13)	3.0 $\pm$ 0.2	(13)
A/G	1.06 $\pm$ 0.09	(13)	1.09 $\pm$ 0.18	(13)	1.15 $\pm$ 0.14	(13)	1.05 $\pm$ 0.08	(13)
BUN ; mg/dl	23 $\pm$ 2	(13)	24 $\pm$ 3	(13)	24 $\pm$ 2	(13)	24 $\pm$ 3	(13)
Creatinine ; mg/dl	0.7 $\pm$ 0.0	(13)	0.7 $\pm$ 0.1	(13)	0.7 $\pm$ 0.1	(13)	0.7 $\pm$ 0.1	(13)
Glucose ; mg/dl	196 $\pm$ 15	(13)	201 $\pm$ 12	(13)	191 $\pm$ 20	(13)	204 $\pm$ 49	(13)
Total cholesterol ; mg/dl	62 $\pm$ 11	(13)	59 $\pm$ 8	(13)	57 $\pm$ 10	(13)	49 $\pm$ 11 **	(13)
γ -GTP ; U/l	0 $\pm$ 0	(13)	0 $\pm$ 0	(13)	0 $\pm$ 0	(13)	0 $\pm$ 0	(13)
Total bilirubin ; mg/dl	0.06 $\pm$ 0.02	(13)	0.05 $\pm$ 0.02	(13)	0.06 $\pm$ 0.02	(13)	0.07 $\pm$ 0.03	(13)
Alkaline phosphatase ; U/l	382 $\pm$ 88	(13)	397 $\pm$ 83	(13)	351 $\pm$ 72	(13)	387 $\pm$ 81	(13)
GPT ; U/l	31 $\pm$ 6	(13)	35 $\pm$ 8	(13)	31 $\pm$ 7	(13)	32 $\pm$ 6	(13)
GOT ; U/l	49 $\pm$ 8	(13)	52 $\pm$ 9	(13)	52 $\pm$ 8	(13)	63 $\pm$ 8 **	(13)
Inorganic phosphorus ; mg/dl	7.3 $\pm$ 0.2	(13)	7.0 $\pm$ 0.5	(13)	6.6 $\pm$ 0.6 **	(13)	6.3 $\pm$ 0.7 **	(13)
Calcium ; mg/dl	9.6 $\pm$ 0.3	(13)	9.2 $\pm$ 0.3	(13)	9.1 $\pm$ 0.2 **	(13)	9.1 $\pm$ 0.6 **	(13)
Sodium ; mEq/l	140.6 $\pm$ 1.0	(13)	140.5 $\pm$ 1.0	(13)	140.3 $\pm$ 0.8	(13)	141.3 $\pm$ 0.7	(13)
Potassium ; mEq/l	4.45 $\pm$ 0.14	(13)	4.36 $\pm$ 0.26	(13)	4.39 $\pm$ 0.22	(13)	4.30 $\pm$ 0.56 *	(13)
Chloride ; mEq/l	100.6 $\pm$ 1.3	(13)	101.0 $\pm$ 1.4	(13)	101.3 $\pm$ 1.8	(13)	102.9 $\pm$ 2.4 **	(13)

Vehicle control ; 5.0% GUM ARABIC

Total bilirubin ; direct bilirubin + indirect bilirubin

* : Significant difference from control, $p < 0.05$ ** : Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 17 Summary of macroscopic findings in male rats administered D & C Red 7 for 42 days

Group Grade	Control				100 mg/kg				300 mg/kg				1000 mg/kg			
	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total
(Thymus)																
pink/pale pink	12	0	1	13	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13
dark colored spot	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	12	0	1	13
small	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	12	0	1	13
(Liver)																
pale colored spot	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
accentuated lobular pattern	11	0	2	13	12	0	1	13	13	0	0	13	12	0	1	13
yellowish	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13	11	1	1	13
(Kidney)																
abnormality	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Adrenal)																
abnormality	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Brain)																
hemorrhage in meninx	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Heart)																
abnormality	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Spleen)																
abnormality	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Testis)																
small	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13	12	0	1	13
edema	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Epididymis)																
small	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	12	0	1	13
edema	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Lung)																
dark colored spot	12	0	1	13	11	0	2	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Submaxillary lymph node)																
dark colored spot	13	0	0	13	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13
enlargement	13	0	0	13	12	1	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Skin)																
alopecia	13	0	0	13	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13
crust	13	0	0	13	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13

-: Negative; ±: Slight; +: Positive

Table 18-1 Summary of macroscopic findings in female rats administered D & C Red 7

Group Grade	Control				100 mg/kg				300 mg/kg				1000 mg/kg			
	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total
(Thymus)																
small	13	0	0	13	10	1	2	13	13	0	0	13	7	1	5	13
red spot	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13	12	0	1	13
(Liver)																
accentuated lobular pattern	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
yellowish	12	1	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Kidney)																
pale colored area	13	0	0	13	12	0	1	13	13	0	0	13	12	0	1	13
pale colored cortex	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	12	0	1	13
(Adrenal)																
abnormality	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Brain)																
abnormality	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Heart)																
abnormality	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Spleen)																
dark color	13	0	0	13	12	0	1	13	12	0	1	13	13	0	0	13
enlargement	13	0	0	13	13	0	0	13	12	1	0	13	13	0	0	13
(Adipose tissue)																
decrease	13	0	0	13	12	1	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Abdominal wall)																
herniation	13	0	0	13	13	0	0	13	12	0	1	13	13	0	0	13
(Lung)																
dark colored spot	13	0	0	13	13	0	0	13	12	0	1	13	13	0	0	13
(Stomach)																
thinning of the wall	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13	12	0	1	13
(Ileum)																
diverticulum	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13	13	0	0	13
(Mesenteric lymph node)																
small	13	0	0	13	13	0	0	13	12	0	1	13	13	0	0	13
(Uterus)																
partial hypertrophy	13	0	0	13	12	0	1	13	13	0	0	13	13	0	0	13

-: Negative; ±: Slight; +: Positive

Table 18-2 Summary of macroscopic findings in female rats administered D & C Red 7
(Subjected to autopsy on day 4 of lactation)

Group Grade	Control				100 mg/kg				300 mg/kg				1000 mg/kg			
	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total
(Thymus)																
small	11	0	0	11	8	1	2	11	10	0	0	10	6	1	5	12
red spot	10	0	1	11	11	0	0	11	10	0	0	10	11	0	1	12
(Liver)																
accentuated lobular pattern	11	0	0	11	11	0	0	11	10	0	0	10	12	0	0	12
yellowish	10	1	0	11	11	0	0	11	10	0	0	10	12	0	0	12
(Kidney)																
pale colored area	11	0	0	11	10	0	1	11	10	0	0	10	11	0	1	12
pale colored cortex	11	0	0	11	11	0	0	11	10	0	0	10	11	0	1	12
(Adrenal)																
abnormality	11	0	0	11	11	0	0	11	10	0	0	10	12	0	0	12
(Brain)																
abnormality	11	0	0	11	11	0	0	11	10	0	0	10	12	0	0	12
(Heart)																
abnormality	11	0	0	11	11	0	0	11	10	0	0	10	12	0	0	12
(Spleen)																
dark color	11	0	0	11	10	0	1	11	9	0	1	10	12	0	0	12
enlargement	11	0	0	11	11	0	0	11	9	1	0	10	12	0	0	12
(Adipose tissue)																
decrease	11	0	0	11	10	1	0	11	10	0	0	10	12	0	0	12
(Abdominal wall)																
herniation	11	0	0	11	11	0	0	11	9	0	1	10	12	0	0	12
(Lung)																
dark colored spot	11	0	0	11	11	0	0	11	9	0	1	10	12	0	0	12
(Stomach)																
thinning of the wall	11	0	0	11	11	0	0	11	10	0	0	10	11	0	1	12
(Ileum)																
diverticulum	11	0	0	11	11	0	0	11	10	0	0	10	12	0	0	12
(Mesenteric lymph node)																
small	11	0	0	11	11	0	0	11	9	0	1	10	12	0	0	12
(Uterus)																
partial hypertrophy	11	0	0	11	11	0	0	11	10	0	0	10	12	0	0	12

-: Negative; ±: Slight; +: Positive

Table 18-3 Summary of macroscopic findings in female rats administered D & C Red 7
(Not pregnant)

Group Grade	Control				100 mg/kg				300 mg/kg				1000 mg/kg			
	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total
(Thymus)																
small	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
red spot	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Liver)																
accentuated lobular pattern	1	0	1	2	0				2	0	0	2				0
yellowish	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Kidney)																
pale colored area	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
pale colored cortex	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Adrenal)																
abnormality	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Brain)																
abnormality	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Heart)																
abnormality	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Spleen)																
dark color	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
enlargement	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Adipose tissue)																
decrease	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Abdominal wall)																
herniation	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Lung)																
dark colored spot	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Stomach)																
thinning of the wall	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Ileum)																
diverticulum	1	0	1	2	0				2	0	0	2				0
(Mesenteric lymph node)																
small	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0
(Uterus)																
partial hypertrophy	2	0	0	2	0				2	0	0	2				0

-: Negative; ±: Slight; +: Positive

Table 18-4 Summary of macroscopic findings in female rats administered D & C Red 7
(Total implantation loss)

Group Grade	Control				100 mg/kg				300 mg/kg				1000 mg/kg			
	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total
(Thymus)																
involution				0	1	0	0	1				0				0
red spot				0	1	0	0	1				0				0
(Liver)																
accentuated lobular pattern				0	1	0	0	1				0				0
yellowish				0	1	0	0	1				0				0
(Kidney)																
pale colored area				0	1	0	0	1				0				0
pale colored cortex				0	1	0	0	1				0				0
(Adrenal)																
abnormality				0	1	0	0	1				0				0
(Brain)																
abnormality				0	1	0	0	1				0				0
(Heart)																
abnormality				0	1	0	0	1				0				0
(Spleen)																
dark color				0	1	0	0	1				0				0
enlargement				0	1	0	0	1				0				0
(Adipose tissue)																
decrease				0	1	0	0	1				0				0
(Abdominal wall)																
herniation				0	1	0	0	1				0				0
(Lung)																
dark colored spot				0	1	0	0	1				0				0
(Stomach)																
thinning of the wall				0	1	0	0	1				0				0
(Ileum)																
diverticulum				0	1	0	0	1				0				0
(Mesenteric lymph node)																
small				0	1	0	0	1				0				0
(Uterus)																
partial hypertrophy				0	0	0	1	1				0				0

-: Negative; ±: Slight; +: Positive

Table 18-5 Summary of macroscopic findings in female rats administered D & C Red 7
(Total litter loss)

Group Grade	Control				100 mg/kg				300 mg/kg				1000 mg/kg			
	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total
(Thymus)																
small				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
red spot				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Liver)																
accentuated lobular pattern				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
yellowish				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Kidney)																
pale colored area				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
pale colored cortex				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Adrenal)																
abnormality				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Brain)																
abnormality				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Heart)																
abnormality				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Spleen)																
dark color				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
enlargement				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Adipose tissue)																
decrease				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Abdominal wall)																
herniation				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Lung)																
dark colored spot				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Stomach)																
thinning of the wall				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Ileum)																
diverticulum				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Mesenteric lymph node)																
small				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0
(Uterus)																
partial hypertrophy				0	1	0	0	1	1	0	0	1				0

-: Negative; ±: Slight; +: Positive

Table 18-6 Summary of macroscopic findings in female rats administered D & C Red 7
(Not copulated)

Group Grade	Control				100 mg/kg				300 mg/kg				1000 mg/kg			
	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total	-	±	+	Total
(Thymus)																
small				0				0				0	1	0	0	1
red spot				0				0				0	1	0	0	1
(Liver)																
accentuated lobular pattern				0				0				0	1	0	0	1
yellowish				0				0				0	1	0	0	1
(Kidney)																
pale colored area				0				0				0	1	0	0	1
pale colored cortex				0				0				0	1	0	0	1
(Adrenal)																
abnormality				0				0				0	1	0	0	1
(Brain)																
abnormality				0				0				0	1	0	0	1
(Heart)																
abnormality				0				0				0	1	0	0	1
(Spleen)																
dark color				0				0				0	1	0	0	1
enlargement				0				0				0	1	0	0	1
(Adipose tissue)																
decrease				0				0				0	1	0	0	1
(Abdominal wall)																
herniation				0				0				0	1	0	0	1
(Lung)																
dark colored spot				0				0				0	1	0	0	1
(Stomach)																
thinning of the wall				0				0				0	1	0	0	1
(Ileum)																
diverticulum				0				0				0	1	0	0	1
(Mesenteric lymph node)																
small				0				0				0	1	0	0	1
(Uterus)																
partial hypertrophy				0				0				0	1	0	0	1

-: Negative; ±: Slight; +: Positive

Table 19

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Absolute and relative organ weight of F₀ males; Mean±S.D. (N)

Compounds		Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)		0	100	300	1000
Final body weight	(g)	472.8 ± 34.5 (13)	458.9 ± 29.2 (13)	459.2 ± 44.9 (13)	447.4 ± 34.2 (13)
Liver	(g)	18.40 ± 2.38 ^{a)} (13) 3.88 ± 0.26 ^{b)}	17.59 ± 2.23 (13) 3.83 ± 0.32	17.70 ± 3.00 (13) 3.84 ± 0.34	17.01 ± 1.98 (13) 3.80 ± 0.24
Kidneys	(g)	2.97 ± 0.30 (13) 0.63 ± 0.05	2.95 ± 0.25 (13) 0.64 ± 0.06	2.95 ± 0.28 (13) 0.64 ± 0.04	3.12 ± 0.36 (13) 0.70 ± 0.06 ^{**}
Thymus	(mg)	378.9 ± 69.8 (13) 80.0 ± 12.5	384.5 ± 66.3 (13) 84.1 ± 15.5	414.9 ± 108.5 (13) 90.1 ± 21.4	368.8 ± 62.0 (13) 82.5 ± 13.3
Testis	(g)	3.03 ± 0.28 (13) 0.64 ± 0.08	3.13 ± 0.25 (13) 0.68 ± 0.06	3.05 ± 0.20 (13) 0.67 ± 0.03	2.97 ± 0.37 (13) 0.66 ± 0.07
Epididymis	(g)	1.34 ± 0.98 (13) 0.29 ± 0.24	1.13 ± 0.07 (13) 0.25 ± 0.02	1.09 ± 0.08 (13) 0.24 ± 0.02	1.28 ± 0.82 (13) 0.29 ± 0.19

a) : Absolute weight

b) : Relative weight(g or mg per 100g body weight)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

^{**} : Significant difference from control, p<0.01

Table 20

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Absolute and relative organ weight of F₀ females; Mean±S.D. (N)

Compounds		Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)		0	100	300	1000
Final body weight	(g)	318.3 ± 15.8 (11)	301.2 ± 23.6 (11)	298.6 ± 30.4 (11)	300.7 ± 31.5 (12)
Liver	(g)	12.71 ± 1.98 ^{a)} (11)	12.59 ± 1.09 (11)	11.98 ± 2.19 (11)	12.80 ± 1.87 (12)
		3.99 ± 0.56 ^{b)}	4.19 ± 0.34	3.99 ± 0.46	4.27 ± 0.53
Kidneys	(g)	1.98 ± 0.14 (11)	2.03 ± 0.19 (11)	2.07 ± 0.30 (11)	2.12 ± 0.34 (12)
		0.62 ± 0.04	0.68 ± 0.08	0.71 ± 0.18	0.71 ± 0.11
Thymus	(mg)	224.6 ± 80.6 (11)	124.1 ± 52.0 ^{**} (11)	169.2 ± 88.3 (11)	146.2 ± 66.6 [*] (12)
		70.0 ± 22.7	40.9 ± 16.5 [*]	56.2 ± 29.3	47.4 ± 19.0

a) : Absolute weight

b) : Relative weight(g or mg per 100g body weight)

Vehicle control : 5% Gum Arabic

* :Significant difference from control, p<0.05

** :Significant difference from control, p<0.01

Table 21

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Absolute and relative organ weight of F₀ females ; Organ weight of animals, which sacrificed on the way of test period

Origin of dissection	Dose groups (mg/kg)	Animal no.	Final body weight (g)	Liver		Kidneys		Thymus	
				Absolute (g)	Relative	Absolute (g)	Relative	Absolute (mg)	Relative
Not copulated	1000	FB04004	276.7	10.08	3.64	1.90	0.69	378.1	136.6
Not pregnant	Vehicle control ^{a)}	FB01002 ^{b)}	296.6	11.36	3.83	1.84	0.62	298.2	100.5
		FB01006	310.7	12.21	3.93	1.97	0.63	350.7	112.9
	300	FB03001	326.3	10.82	3.32	1.83	0.56	400.1	122.6
		FB03013	261.9	8.08	3.09	1.70	0.65	289.7	110.6
Total implantation loss	100	FB02010	293.6	10.34	3.52	2.07	0.71	363.8	123.9
Total litter loss	100	FB02008	336.1	13.97	4.16	2.38	0.71	108.6	32.3

Relative: g or mg per 100g body weight

a) Vehicle control: 5% Gum Arabic

b) Identification no. : F₀ code = sex- course- group no. — individual no.

Table 22 Summary of histopathological findings in male rats administered with D & C Red 7 for 42 days

Group Grade	Control (n=13)					100 mg/kg (n=13)					300 mg/kg (n=13)					1000 mg/kg (n=13)				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Thymus)																				
hemorrhage	12	0	1	0	0											11	1	1	0	0
involution	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Liver)																				
microgranuloma	3	10	0	0	0											3	10	0	0	0
fatty change in peripheral zone	12	0	1	0	0											9	0	4	0	0
focal necrosis	13	0	0	0	0											12	1	0	0	0
(Kidney)																				
necrosis of tubular epithelium	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
foamy tubular epithelial cell	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
regeneration of																				
tubular epithelium	7	6	0	0	0	5	8	0	0	0	0	10	2	1	0	1	0	10	2	0
debris in the tubular lumen	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	12	0	1	0	0	5	3	4	1	0
cast in the tubular lumen	13	0	0	0	0	12	1	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
chronic nephropathy	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
vacuolation in tubular epithelium	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
focal dilatation of tubule	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
eosinophilic body	7	1	4	1	0	4	1	5	3	0	4	5	1	3	0	6	0	6	1	0
(Adrenal)																				
brown pigment	9	4	0	0	0											9	4	0	0	0
focal necrosis in cortex	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Brain)																				
abnormality	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Heart)																				
myocardial degeneration	11	2	0	0	0											13	0	0	0	0
(Spleen)																				
brown pigment	0	0	13	0	0											0	2	11	0	0
extramedullary hematopoiesis	0	4	9	0	0											0	7	6	0	0
(Testis)																				
atrophy of tubule	11	0	1	1	0											10	0	2	1	0
calcification	13	0	0	0	0											12	0	1	0	0
(Epididymis)																				
decreased number of sperm	12	0	0	1	0											12	0	0	1	0

-: Negative; ±: Very slight; +: Slight; ++: Moderate; +++: Severe

Table 23-1 Summary of histopathological findings in female rats administered with D & C Red 7

Group Grade	Control (n=13)					100 mg/kg (n=13)					300 mg/kg (n=13)						1000 mg/kg (n=13)				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	NE	-	±	+	++	+++
(Thymus)																					
hemorrhage	13	0	0	0	0												13	0	0	0	0
involution	11	1	1	0	0												7	1	3	2	0
(Liver)																					
microgranuloma	11	2	0	0	0												11	2	0	0	0
fatty change in peripheral zone	10	1	2	0	0												11	1	0	1	0
focal necrosis	13	0	0	0	0												13	0	0	0	0
(Kidney)																					
necrosis of tubular epithelium	13	0	0	0	0	8	1	3	1	0	9	1	2	0	0	1	8	1	3	1	0
foamy tubular epithelial cell	13	0	0	0	0	7	0	3	3	0	4	4	1	3	0	1	6	0	1	4	2
regeneration of																					
tubular epithelium	9	3	1	0	0	5	3	3	2	0	5	4	2	1	0	1	4	1	1	6	1
debris in the tubular lumen	13	0	0	0	0	12	1	0	0	0	12	0	0	0	0	1	8	1	2	2	0
cast in the tubular lumen	12	0	1	0	0	13	0	0	0	0	12	0	0	0	0	1	12	0	1	0	0
chronic nephropathy	12	1	0	0	0	13	0	0	0	0	12	0	0	0	0	1	13	0	0	0	0
vacuolation in tubular epithelium	12	0	1	0	0	12	1	0	0	0	12	0	0	0	0	1	13	0	0	0	0
focal dilatation of tubule	13	0	0	0	0	12	0	1	0	0	12	0	0	0	0	1	12	0	1	0	0
eosinophilic body	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	12	0	0	0	0	1	13	0	0	0	0
(Adrenal)																					
brown pigment	13	0	0	0	0												12	1	0	0	0
focal necrosis in cortex	13	0	0	0	0												12	0	1	0	0
(Brain)																					
abnormality	13	0	0	0	0												13	0	0	0	0
(Heart)																					
myocardial degeneration	13	0	0	0	0												13	0	0	0	0
(Spleen)																					
brown pigment	0	1	12	0	0												0	0	13	0	0
extramedullary hematopoiesis	0	1	7	5	0												0	2	7	4	0
(Ovary)																					
abnormality	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0		1	0	0	0	0

-: Negative; ±: Very slight; +: Slight; ++: Moderate; +++: Severe; NE: Not examined

Table 23-2 Summary of histopathological findings in female rats administered with D & C Red 7
(Subjected to autopsy on day 4 of lactation)

Group Grade	Control (n=11)					100 mg/kg (n=11)					300 mg/kg (n=10)						1000 mg/kg (n=12)				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	NE	-	±	+	++	+++
(Thymus)																					
hemorrhage	11	0	0	0	0												12	0	0	0	0
involution	9	1	1	0	0												6	1	3	2	0
(Liver)																					
microgranuloma	10	1	0	0	0												10	2	0	0	0
fatty change in peripheral zone	8	1	2	0	0												10	1	0	1	0
focal necrosis	11	0	0	0	0												12	0	0	0	0
(Kidney)																					
necrosis of tubular epithelium	11	0	0	0	0	7	0	3	1	0	6	1	2	0	0	1	7	1	3	1	0
foamy tubular epithelial cell	11	0	0	0	0	6	0	3	2	0	2	3	1	3	0	1	5	0	1	4	2
regeneration of																					
tubular epithelium	7	3	1	0	0	5	1	3	2	0	3	3	2	1	0	1	3	1	1	6	1
debris in the tubular lumen	11	0	0	0	0	10	1	0	0	0	9	0	0	0	0	1	7	1	2	2	0
cast in the tubular lumen	10	0	1	0	0	11	0	0	0	0	9	0	0	0	0	1	11	0	1	0	0
chronic nephropathy	10	1	0	0	0	11	0	0	0	0	9	0	0	0	0	1	12	0	0	0	0
vacuolation in tubular epithelium	10	0	1	0	0	10	1	0	0	0	9	0	0	0	0	1	12	0	0	0	0
focal dilatation of tubule	11	0	0	0	0	11	0	0	0	0	9	0	0	0	0	1	11	0	1	0	0
eosinophilic body	11	0	0	0	0	11	0	0	0	0	9	0	0	0	0	1	12	0	0	0	0
(Adrenal)																					
brown pigment	11	0	0	0	0												11	1	0	0	0
focal necrosis in cortex	11	0	0	0	0												11	0	1	0	0
(Brain)																					
abnormality	11	0	0	0	0												12	0	0	0	0
(Heart)																					
myocardial degeneration	11	0	0	0	0												12	0	0	0	0
(Spleen)																					
brown pigment	0	1	10	0	0												0	0	12	0	0
extramedullary hematopoiesis	0	0	6	5	0												0	2	6	4	0
(Ovary)																					
abnormality																					

-: Negative; ±: Very slight; +: Slight; ++: Moderate; +++: Severe; NE: Not examined

Table 23-3 Summary of histopathological findings in female rats administered with D & C Red 7
(Not pregnant)

Group Grade	Control (n= 2)					100 mg/kg (n= 0)					300 mg/kg (n= 2)					1000 mg/kg (n= 0)				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Thymus)																				
hemorrhage	2	0	0	0	0															
involution	2	0	0	0	0															
(Liver)																				
microgranuloma	1	1	0	0	0															
fatty change in peripheral zone	2	0	0	0	0															
focal necrosis	2	0	0	0	0															
(Kidney)																				
necrosis of tubular epithelium	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0					
foamy tubular epithelial cell	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0					
regeneration of																				
tubular epithelium	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0					
debris in the tubular lumen	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0					
cast in the tubular lumen	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0					
chronic nephropathy	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0					
vacuolation in tubular epithelium	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0					
focal dilatation of tubule	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0					
eosinophilic body	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0					
(Adrenal)																				
brown pigment	2	0	0	0	0															
focal necrosis in cortex	2	0	0	0	0															
(Brain)																				
abnormality	2	0	0	0	0															
(Heart)																				
myocardial degeneration	2	0	0	0	0															
(Spleen)																				
brown pigment	0	0	2	0	0															
extramedullary hematopoiesis	0	1	1	0	0															
(Ovary)																				
abnormality	2	0	0	0	0						2	0	0	0	0					

-: Negative; ±: Very slight; +: Slight; ++: Moderate; +++: Severe

Table 23-4 Summary of histopathological findings in female rats administered with D & C Red 7
(Total implantation loss)

Group	Control (n= 0)					100 mg/kg (n= 1)					300 mg/kg (n= 0)					1000 mg/kg (n= 0)				
Grade	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Thymus)																				
hemorrhage																				
involution																				
(Liver)																				
microgranuloma																				
fatty change in peripheral zone																				
focal necrosis																				
(Kidney)																				
necrosis of tubular epithelium						1	0	0	0	0										
foamy tubular epithelial cell						1	0	0	0	0										
regeneration of																				
tubular epithelium						0	1	0	0	0										
debris in the tubular lumen						1	0	0	0	0										
cast in the tubular lumen						1	0	0	0	0										
chronic nephropathy						1	0	0	0	0										
vacuolation in tubular epithelium						1	0	0	0	0										
focal dilatation of tubule						0	0	1	0	0										
eosinophilic body						1	0	0	0	0										
(Adrenal)																				
brown pigment																				
focal necrosis in cortex																				
(Brain)																				
abnormality																				
(Heart)																				
myocardial degeneration																				
(Spleen)																				
brown pigment																				
extramedullary hematopoiesis																				
(Ovary)																				
abnormality																				

-: Negative; ±: Very slight; +: Slight; ++: Moderate; +++: Severe

Table 23-5 Summary of histopathological findings in female rats administered with D & C Red 7
(Total litter loss)

Group	Control (n= 0)					100 mg/kg (n= 1)					300 mg/kg (n= 1)					1000 mg/kg (n= 0)				
Grade	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Thymus)																				
hemorrhage																				
involution																				
(Liver)																				
microgranuloma																				
fatty change in peripheral zone																				
focal necrosis																				
(Kidney)																				
necrosis of tubular epithelium						0	1	0	0	0	1	0	0	0	0					
foamy tubular epithelial cell						0	0	0	1	0	0	1	0	0	0					
regeneration of																				
tubular epithelium						0	1	0	0	0	0	1	0	0	0					
debris in the tubular lumen						1	0	0	0	0	1	0	0	0	0					
cast in the tubular lumen						1	0	0	0	0	1	0	0	0	0					
chronic nephropathy						1	0	0	0	0	1	0	0	0	0					
vacuolation in tubular epithelium						1	0	0	0	0	1	0	0	0	0					
focal dilatation of tubule						1	0	0	0	0	1	0	0	0	0					
eosinophilic body						1	0	0	0	0	1	0	0	0	0					
(Adrenal)																				
brown pigment																				
focal necrosis in cortex																				
(Brain)																				
abnormality																				
(Heart)																				
myocardial degeneration																				
(Spleen)																				
brown pigment																				
extramedullary hematopoiesis																				
(Ovary)																				
abnormality																				

-: Negative; ±: Very slight; +: Slight; ++: Moderate; +++: Severe

Table 23-6 Summary of histopathological findings in female rats administered with D & C Red 7
(Not copulated)

Group	Control (n= 0)					100 mg/kg (n= 0)					300 mg/kg (n= 0)					1000 mg/kg (n= 1)				
Grade	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Thymus)																				
hemorrhage																1	0	0	0	0
involution																1	0	0	0	0
(Liver)																				
microgranuloma																1	0	0	0	0
fatty change in peripheral zone																1	0	0	0	0
focal necrosis																1	0	0	0	0
(Kidney)																				
necrosis of tubular epithelium																1	0	0	0	0
foamy tubular epithelial cell																1	0	0	0	0
regeneration of																				
tubular epithelium																1	0	0	0	0
debris in the tubular lumen																1	0	0	0	0
cast in the tubular lumen																1	0	0	0	0
chronic nephropathy																1	0	0	0	0
vacuolation in tubular epithelium																1	0	0	0	0
focal dilatation of tubule																1	0	0	0	0
eosinophilic body																1	0	0	0	0
(Adrenal)																				
brown pigment																1	0	0	0	0
focal necrosis in cortex																1	0	0	0	0
(Brain)																				
abnormality																1	0	0	0	0
(Heart)																				
myocardial degeneration																1	0	0	0	0
(Spleen)																				
brown pigment																0	0	1	0	0
extramedullary hematopoiesis																0	0	1	0	0
(Ovary)																				
abnormality																1	0	0	0	0

-: Negative; ±: Very slight; +: Slight; ++: Moderate; +++: Severe

Table 24

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Summary of reproductive performance

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	12
Copulation index A)	100.0	100.0	100.0	92.3
Number of pregnant animals	11	13	11	12
Fertility index B)	84.6	100.0	84.6	100.0
Pairing days until copulation Mean $\pm$ S.D.	2.7 $\pm$ 1.3	3.2 $\pm$ 2.8	3.1 $\pm$ 2.0	2.7 $\pm$ 1.6

Vehicle control: 5% Gum Arabic

A): Copulation index = (Number of copulated pairs / Number of mated pairs) $\times$ 100 ; %B): Fertility index = (Number of pregnant animals / Number of copulated pairs) $\times$ 100 ; %

Table 25

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Summary of development of F1 pups up to day 4 of lactation; Mean $\pm$ S.D.

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Number of pregnant females	11	13	11	12
Number of pregnant females with pups alive	11	12	11	12
Gestation index A)	100.0	92.3	100.0	100.0
Gestation length in days	22.5 $\pm$ 0.5 (11)	22.6 $\pm$ 0.5 (12)	22.8 $\pm$ 0.4 (11)	22.7 $\pm$ 0.5 (12)
Number of corpora lutea	18.5 $\pm$ 2.3 (11)	20.2 $\pm$ 7.7 (13)	19.0 $\pm$ 5.9 (11)	18.7 $\pm$ 1.2 (12)
Number of implantation sites	14.1 $\pm$ 3.6 (11)	16.8 $\pm$ 5.3 (13)	15.1 $\pm$ 5.4 (11)	15.1 $\pm$ 4.1 (12)
Implantation index B)	76.0 $\pm$ 15 (11)	83.4 $\pm$ 24.9 (13)	79.0 $\pm$ 18.8 (11)	80.9 $\pm$ 22.0 (12)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	12.5 $\pm$ 4.3 (11)	13.5 $\pm$ 4.8 (13)	11.8 $\pm$ 2.9 (11)	13.3 $\pm$ 3.7 (12)
Delivery index C)	86.4 $\pm$ 20.7 (11)	74.9 $\pm$ 26.7 (13)	82.9 $\pm$ 16.3 (11)	87.3 $\pm$ 7.6 (12)
Number of pups alive	12.5 $\pm$ 4.3 (11)	13.9 $\pm$ 2.8 (12)	11.7 $\pm$ 2.9 (11)	13.2 $\pm$ 3.7 (12)
Birth index D)	86.4 $\pm$ 20.7 (11)	71.9 $\pm$ 27.5 (13)	82.3 $\pm$ 16.2 (11)	86.8 $\pm$ 7.8 (12)
Live birth index E)	100.0 $\pm$ 0.0 (11)	95.2 $\pm$ 10.0 (12)	99.3 $\pm$ 2.3 (11)	99.4 $\pm$ 1.9 (12)
Sex ratio F)	56.9 $\pm$ 19.0 (11)	49.0 $\pm$ 15.4 (12)	47.2 $\pm$ 17.9 (11)	45.8 $\pm$ 14.4 (12)
Day 4 of lactation				
Number of pups alive	12.5 $\pm$ 4.3 (11)	12.1 $\pm$ 5.3 (12)	10.1 $\pm$ 4.3 (11)	12.7 $\pm$ 3.4 (12)
Viability index G)	99.4 $\pm$ 2.0 (11)	85.2 $\pm$ 30.1 (12)	87.7 $\pm$ 30.2 (11)	96.9 $\pm$ 6.1 (12)

Parenthesis indicates the number of litters evaluated

A): Gestation index = (Number of pregnant females with pups alive / Number of pregnant females) $\times$ 100 ; %B): Implantation index = (Number of implantation sites / Number of corpora lutea) $\times$ 100 ; %C): Delivery index = (Number of pups born / Number of implantation sites) $\times$ 100 ; %D): Birth index = (Number of pups alive on Day 0 / Number of implantation sites) $\times$ 100 ; %E): Live birth index = (Number of pups alive on Day 0 / Number of pups born) $\times$ 100 ; %F): Sex ratio = (Number of male pups alive on Day 0 / Number of pups alive on Day 0) $\times$ 100 ; %G): Viability index = (Number of pups alive on Day 4 / Number of pups alive on Day 0) $\times$ 100 ; %

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table 26

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Body weight of F1 pups up to day 4 of lactation; Mean $\pm$ S.D.

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
Day 0 (At birth)				
Live litter size	12.5 $\pm$ 4.3 (11)	13.9 $\pm$ 2.8 (12)	11.7 $\pm$ 2.9 (11)	13.2 $\pm$ 3.7 (12)
Male	6.7 $\pm$ 2.7	6.8 $\pm$ 2.4	5.7 $\pm$ 2.8	5.9 $\pm$ 2.5
Female	5.8 $\pm$ 2.7	7.2 $\pm$ 2.7	6.0 $\pm$ 2.4	7.3 $\pm$ 2.6
Pup weight in grams	6.5 $\pm$ 0.8	5.7 $\pm$ 0.9	6.7 $\pm$ 0.7	6.4 $\pm$ 1.0
Male	6.7 $\pm$ 0.8	5.9 $\pm$ 0.9	6.9 $\pm$ 0.7	6.6 $\pm$ 1.1
Female	5.6 $\pm$ 2.0	5.6 $\pm$ 0.8	6.6 $\pm$ 0.8	6.2 $\pm$ 1.0
Day 4				
Live litter size	12.5 $\pm$ 4.3 (11)	13.2 $\pm$ 3.8 (11)	11.1 $\pm$ 2.8 (10)	12.7 $\pm$ 3.4 (12)
Male	6.7 $\pm$ 2.7	6.3 $\pm$ 2.8	5.6 $\pm$ 3.0	5.7 $\pm$ 2.4
Female	5.7 $\pm$ 2.7	6.9 $\pm$ 3.0	5.5 $\pm$ 2.0	7.0 $\pm$ 2.6
Pup weight in grams	10.0 $\pm$ 1.6	8.5 $\pm$ 1.2	10.2 $\pm$ 2.0	9.4 $\pm$ 1.9
Male	10.3 $\pm$ 1.6	8.8 $\pm$ 1.3	10.5 $\pm$ 2.0	9.6 $\pm$ 1.9
Female	8.7 $\pm$ 3.3	8.3 $\pm$ 1.1	10.0 $\pm$ 2.0	9.2 $\pm$ 1.9

Parenthesis indicates the number of litters evaluated

Vehicle control: 5% Gum Arabic

Table 27

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Summary of morphological observation of pups

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of pups examined				
<u>External observation</u>	137	145	122	152
<u>Visceral observation</u>	137	145	122	152
No. of pups showing abnormalities				
<u>External abnormalities</u>	0	0	0	0
<u>Visceral abnormalities</u>				
Major abnormalities	0	0	0	0
Minor abnormalities	0	1	0	0
Types and frequencies (%) of visceral abnormalities				
<u>Minor abnormalities</u>				
Persistent left umbilical artery		0.6		

Vehicle control : 5% Gum Arabic

Table 28

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test for D & C Red 7 in rats

Summary of morphological observation of F₁ dead pups

Compounds	Vehicle control	D & C Red 7	D & C Red 7	D & C Red 7
Dose groups (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of dead pups examined				
External observation	0	4	1	2
Visceral observation	0	4	1	2
No. of dead pups showing abnormalities				
External abnormalities	—	0	0	0
Visceral abnormalities				
Major abnormalities	—	0	0	0
Minor abnormalities	—	0	0	0

Vehicle control : 5% Gum Arabic