

# 最終報告書

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩の  
ラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験  
(試験番号：10-036)

## 陳 述 書 (I)

### 試験の表題

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩のラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験 (試験番号: 10-036)

本試験は、OECD 試験法ガイドライン[OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS for Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test 421、(1995)]並びに化学物質 GLP「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121003 号厚生労働省医薬食品局長、平成 15 年・11・17 製局第 3 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 031121004 号環境省総合環境政策局長、連名通知)(最終改正:平成 18 年 11 月 20 日付け薬食発第 1120001 号、平成 18・11・13 製局第 5 号及び環境企発第 061120001 号)に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者

安全性研究部 首席研究員



平成 23 年 3 月 23 日

## 陳 述 書 (Ⅱ)

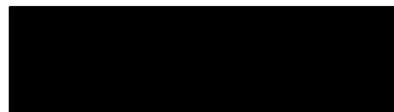
### 試験の表題

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩のラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験 (試験番号: 10-036)

本試験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号)、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「厚生労働省の所管する実施機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」及び「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(2006 年 6 月 1 日、日本学術会議)に基づき、実験動物を科学的観点及び倫理的な配慮の下に実施するべき事項を定めた、「財団法人 畜産生物科学安全研究所の動物実験実施規定」に従い、実験動物委員会の承認を得て、実施した。

試験責任者

安全性研究部 首席研究員



平成 23 年 3 月 23 日

## 試験の表題

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩のラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験（試験番号：10-036）

## 試験委託者

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

## 試験実施施設

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所  
所在地 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11  
運営管理者 専務理事 [REDACTED]  
試験責任者 安全性研究部 [REDACTED]  
信頼性保証責任者 信頼性保証室 [REDACTED]

## 試験日程

試験開始	平成 22 年 9 月 7 日
動物搬入	平成 22 年 9 月 9 日
実験開始	平成 22 年 9 月 22 日
投与開始	平成 22 年 9 月 23 日
交配開始	平成 22 年 10 月 7 日
児動物解剖開始	平成 22 年 11 月 3 日
雌親解剖開始	平成 22 年 11 月 4 日
雄親解剖	平成 22 年 11 月 4 日
実験終了	平成 23 年 2 月 24 日
試験終了	平成 23 年 3 月 23 日

予見することができなかつた試験に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書からの逸脱

本試験に関し、予見することのできなかつた試験成績の信頼性に影響を及ぼす疑いの

ある事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

#### 試験資料の保管

次に示す本試験に関する一連の関係試験資料は、試験終了後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の処置については、試験委託者と協議して決定する。

- 1) 試験計画書
- 2) 被験物質に関する記録およびそのサンプル
- 3) 供試動物に関する記録
- 4) 試験結果に関する記録（親動物の一般状態、体重、摂餌量、性周期、交配、分娩、哺育、剖検、器官重量、病理組織学検査ならびに児動物の一般状態、成長、外表および内臓検査等に関する生データ）
- 5) 病理標本（固定器官、包埋ブロック、組織標本）
- 6) 信頼性保証に関する記録
- 7) 最終報告書

#### 試験責任者の署名および試験担当者の業務分担

##### 試験責任者

財団法人 畜産生物科学安全研究所

安全性研究部 首席研究員

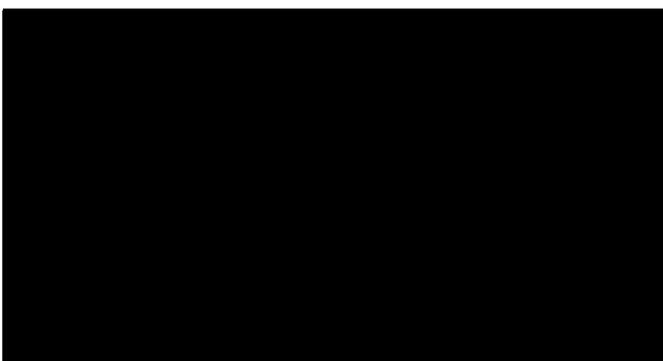
氏名



平成 23 年 3 月 23 日

#### 試験担当者およびその業務分担

検疫責任者	:
投与液の分析	:
投与液の調製	:
動物飼育・投与・臨床観察	:
病理検査	:



## 信頼性保証証明書

試験表題 : 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩のラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号 : 10-036

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
1. 試験計画書審査 平成22年09月07日	平成22年09月07日	平成22年09月07日
2. 試験計画書記載事項変更審査  (変-1) 平成23年01月12日	平成23年01月12日	平成23年01月12日
3. 試験実施状況査察		
動物導入 平成22年09月09日	平成22年09月09日	平成22年09月09日
検 疫 平成22年09月10日	平成22年09月10日	平成22年09月10日
体重測定・群分け・個体識別・被験物質調製 平成22年09月22日	平成22年09月22日	平成22年09月22日
餌測定・投与・症状観察 平成22年09月24日	平成22年09月24日	平成22年09月24日
交配開始 平成22年10月07日	平成22年10月07日	平成22年10月07日
交尾確認 平成22年10月08日	平成22年10月08日	平成22年10月08日
餌測定・体重測定・投与・症状観察 平成22年10月20日	平成22年10月20日	平成22年10月20日
被験物質調製 平成22年10月27日	平成22年10月27日	平成22年10月27日
分娩の確認 平成22年11月01日	平成22年11月01日	平成22年11月01日
解剖(雄・雌・新生児)・病理組織標本作製(臓器・組織の固定) 平成22年11月04日	平成22年11月04日	平成22年11月04日
病理組織標本作製(切り出し) 平成22年12月22日	平成22年12月22日	平成22年12月22日
病理組織標本作製(包埋) 平成22年12月29日	平成23年01月04日	平成23年01月04日

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
病理組織標本作製(薄切) 平成23年01月07日	平成23年01月07日	平成23年01月07日
病理組織標本作製(染色) 平成23年01月13日	平成23年01月13日	平成23年01月13日
4. 生データ査察 平成23年03月15日	平成23年03月15日	平成23年03月15日
5. 報告書(草案)審査 平成23年03月16日 ～ 同年03月17日	平成23年03月17日	平成23年03月17日
6. 最終報告書審査 平成23年03月23日	平成23年03月23日	平成23年03月23日

上記の審査・査察により、本試験が「化審法 GLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用した方法・手順が忠実に記載され、試験成績には、当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認した。

平成 23 年 3 月 23 日  
財団法人 畜産生物科学安全研究所

信頼性保証責任者 

## 目次

要約	1 頁
目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 動物および飼育条件	2
3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法	3
4. 観察および検査	4
1) 親動物に関する項目	4
(1) 一般状態	4
(2) 体重および摂餌量	4
(3) 雌の性周期検査	4
(4) 交配および分娩状態観察	5
(5) 剖検および器官重量	5
(6) 病理組織学検査	5
2) 新生児に関する項目	6
(1) 産児数、性比および外表観察	6
(2) 一般状態・生児数	6
(3) 体重	6
(4) 病理学検査	6
5. 統計解析	6
結果	8
1. 反復投与毒性	8
1) 一般状態および死亡	8
2) 体重	8
3) 摂餌量	8
4) 剖検	8
5) 器官重量	8
6) 病理組織学検査	8

2. 生殖発生毒性	9	
1) 親動物に及ぼす影響	9	
(1) 性周期検査	9	
(2) 交尾率および受胎率	9	
(3) 黄体数、着床数および着床率	9	
(4) 妊娠期間および出産率	9	
(5) 分娩および哺育状態	9	
2) 新生児に及ぼす影響	9	
(1) 生存性および体重	9	
(2) 病理学検査	9	
考察	11	
文献	12	
添付資料		
A 図・群別平均値表		
Figures 1、2	体重	1
Figures 3、4	摂餌量	3
Tables 1、2	一般状態および死亡率	5
Tables 3、4	体重	7
Tables 5、6	摂餌量	9
Tables 7、8	剖検	11
Table 9	器官重量	13
Tables 10、11	病理組織学検査	14
Table 12	生殖に及ぼす影響	17
Table 13	新生児に及ぼす影響	18
Table 14	新生児の外表所見	19
Table 15	新生児の内臓所見	20
B. 個体別表等		
Appendix 1	被験物質の特性	1
Appendix 2	被験物質の投与形態での安定性	3

Appendix 3	投与液中の被験物質濃度の確認	4
Appendix 4	動物室の温度湿度の測定結果	5
Appendix 5	飼料の汚染物質分析	7
Appendix 6	床敷の汚染物質分析	19
Appendix 7	飲料水の水質検査	21
Appendices 8、9	死亡率	22
Appendices 10、11	一般状態	30
Appendices 12、13	体重	34
Appendices 14、15	摂餌量	39
Appendices 16、17	剖検・病理組織学検査	44
Appendices 18、19	器官重量	53
Appendices 20、21	性周期	57
Appendix 22	生殖に及ぼす影響	63
Appendix 23	新生児に及ぼす影響	67
Appendix 24	新生児の外表所見	71
Appendix 25	新生児の内臓所見	75

## 要 約

化学産業の分野において、アゾ系染料、媒洗剤および中間物として使用されている4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩<sup>1)</sup>の0、100、300および1000 mg/kg/dayを、1群雌雄各12匹のSD系ラットに、交配開始2週間前から、雄は42日間、雌は分娩後哺育4日(42~55日間)まで経口投与し、その生殖毒性を調べた。

### 1. 反復投与毒性

1000 mg/kg群で雌雄に単なる内容物の増加による盲腸の軽度な拡張が認められた以外は、いずれの被験物質投与群においても、一般状態、体重、摂餌量、剖検、器官重量および病理組織学検査で毒性影響と考えられる変化は認められなかった。

### 2. 生殖発生毒性

親動物について、性周期(雌)、交尾成立期間、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩率に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

児動物についても、総出産児数、生児総数、生存率、分娩率、出生率、性比、体重および形態に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩の親動物への反復投与において、いずれの被験物質投与群においても毒性影響は認められなかったことから、反復投与毒性における無影響量(NOEL)は雌雄とも1000 mg/kg/dayと推定した。また、生殖発生毒性に関するNOELは、親動物および児動物に対し、いずれの被験物質投与群においても変化が認められなかったことから、いずれも1000 mg/kg/dayと推定した。

## 目 的

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩をラットに反復経口投与し、本物質の生殖毒性を検討した。

## 材料および方法

### 1. 被験物質

被験物質である 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩は、水に溶けにくい灰褐色固体で、試験には、XXXXXXXXXXから購入したロット番号 HGB01（純度 84.8%）の試薬を冷暗所（2～6℃）、密栓下で保管し、使用した。被験物質は、実験終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した（Appendix 1）。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。

被験物質の投与液は、メチルセルロース（和光純薬工業株式会社、100 cp、ロット番号 EWK3873）の 1%水溶液（局方精製水、共栄製薬株式会社）を媒体とし、所定の投与用量となる濃度の懸濁液に調製した。なお、調製の際には、純度換算を行った。調製した投与液は、1日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所（2～6℃）遮光下で密栓して保管した。冷所遮光下で7日間、その後室温遮光下で1日保管した投与液中の被験物質は、安定であることが確認された（Appendix 2）ので、調製後8日以内に使用した。初回に調製された投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した（Appendix 3）。

### 2. 動物および飼育条件

動物は、SD系 [CrI : CD(SD)]ラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター（神奈川県厚木市下古沢 795）から8週齢のものを搬入（雄55匹、雌55匹）し、12日間試験環境に馴化させた。馴化期間中に検疫および雌については10日間の性周期観察も併せて行い、発育および一般健康状態が良好で、雌では性周期に異常の認められなかったものについて、投与開始前日に体重を測定し、体重の平均値に近いものから雌雄各48匹を選び、10週齢で試験に用いた。1群の動物数は雌雄各12匹とし、無作為抽出法により群分けを行った。

投与開始時の平均体重（体重範囲）は、雄384（359～413）g、雌240（217～255）

gであった。ラットは、温度  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 10\%$ 、換気回数 10 回以上/時（オールフレッシュエアー方式）、照明 12 時間/日（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）に設定したバリアーシステム動物室（第 7 室）で、個体別にステンレス製金網ケージ〔260W×380D×180 H(mm)〕に收容し、これをステンレス製 5 段のラックに配置して飼育した。ただし、交尾の成立した雌は、妊娠 0 日に巣作り材料（ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社）を入れたポリカーボネート製ケージ〔265W×426D×200H(mm)〕に收容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料（固型飼料ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社、ロット番号 20100652、20100861、20100957）および飲料水（孔径  $1\mu\text{m}$  のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水）は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶（ポリカーボネートケージの場合）により、自由に摂取させた。

親動物の個体識別は耳パンチ法により行い、ラックおよびケージにはラベルを貼付した。児動物は、個体識別は行わなかった。

飼育期間中、動物室の温度は  $21.1\sim 24.8^{\circ}\text{C}$ 、湿度は  $50\sim 61\%$  の範囲で推移 (Appendix 4) した。また、飼料および巣作り材料の汚染物質の分析結果 (Appendices 5、6) はいずれも、「米国環境保護庁有害物質規制法の飼料および媒体の汚染物質限度 (1979)」等を参考にして当研究所が設定した許容範囲内にあり、飲料水は水道法に基づく水質基準に適合する (Appendix 7) ことが確認された。したがって、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

### 3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

投与量設定試験として、10 週齢のラットを 1 群雌雄各 4 匹用い、100、500 および 1000 mg/kg/day で 14 日間反復経口投与した結果、一般状態、体重、摂餌量、剖検および器官重量において、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

以上のことから、本試験における投与量については、試験法ガイドラインにおける上限量の 1000 mg/kg/day を最高用量とし、以下公比 3 で 300 および 100 mg/kg/day の計 3 用量を設定した。

試験群の構成は、①媒体投与群（以下、対照群）、②被験物質の 100 mg/kg/day 投与

群 (100 mg/kg 群)、③同 300 mg/kg/day 投与群 (300 mg/kg 群)、④同 1000 mg/kg/day 投与群 (1000 mg/kg 群) の 4 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には、媒体として用いたメチルセルロースの 1% 水溶液を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始 14 日前から、雄は 42 日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育 4 日まで、最短 42 日～最長 55 日間、1 日 1 回、午前中 (8 : 56～11 : 57) に投与した。

#### 4. 観察および検査

##### 1) 親動物に関する項目

親動物について、次の項目を観察あるいは検査した。

##### (1) 一般状態

投与開始から解剖日まで毎日、午前と午後の 2 回、動物の生死、外観、行動等について観察した。また、妊娠、出産、哺育の状態については、注意深く観察した。

##### (2) 体重および摂餌量

体重は、雄については投与 1 (投与開始日、投与直前)、7、14、21、28、35 および 42 日、雌は投与 1、7 および 14 日、妊娠 0、7、14 および 20 日並びに哺育 0 および 4 日に、また、屠殺日にも測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて、ケージごとに翌日までの 24 時間飼料消費量を測定した。ただし、摂餌量の最終測定日は、雄では投与 41 日、雌では哺育 3 日とした。投与 21 および 28 日には、交尾が成立していない雌雄の摂餌量は測定しなかった。

##### (3) 雌の性周期検査

雌について、検疫・馴化期間に引き続き、投与開始日から交尾が確認されるまで、Giemsa 染色による膣垢塗抹標本を作製し、鏡検により性周期段階の判定を行った。また、投与開始日から交配開始日までの性周期段階の判定から性周期を算出した。1 性周期は、発情期 (Ⅲ) 像が認められた日から次の発情期像が認められた前日までとし、発情期像が連続した場合は、最初の発情期像が認められた日から起算した。

#### (4) 交配および分娩状態観察

交配前 2 週間の投与を終了（投与 15 日の午後）した雌雄を同一群内で 1 対 1 の組み合わせを作り、2 週間を限度として交尾が確認されるまで連続同居させた。交配期間中は毎朝一定時刻（9：30 頃）に交尾の確認を行い、交尾率（%） $[(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100]$ を算出した。交尾は、膣栓形成あるいは膣垢中の精子の有無により確認し、確認された日を妊娠 0 日とした。分娩完了の確認は、午前 10 時までの時点において、母動物が営巣し、授乳を開始した状態を確認すること、又は母動物の膣周囲の状態を観察し、腹部を触診することによって行った。分娩の完了が確認された日を哺育 0 日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について、受胎率（%） $[(\text{受胎雌数} / \text{交尾成立雌数}) \times 100]$ 、妊娠期間（妊娠 0 日から分娩の完了が確認された日までの日数）および出産率（%） $[(\text{生児出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100]$ を算出した。

#### (5) 剖検および器官重量

雄の計画屠殺動物は投与 42 日の翌日、雌は哺育 5 日に、それぞれエーテル麻酔下で放血屠殺し、体表、開口部粘膜および内部諸器官を肉眼的に観察した。また、各群雄全例の前立腺、精囊（凝固腺含む）、精巣および精巣上体を秤量（絶対重量）し、屠殺日の体重に基づいて対体重比（相対重量）を算出した。なお、対器官は左右を一括して秤量した。雌については、卵巣の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率（%） $[(\text{着床数} / \text{黄体数}) \times 100]$ を算出した。

#### (6) 病理組織学検査

全例について精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣および子宮を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液（精巣、精巣上体はブアン液で前固定）で固定し、保存した。

病理組織学検査は、対照群および 1000 mg/kg 群の雌雄全例の精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣および子宮について実施した。精巣については、精子形成サイクル検査（ステージⅡ・Ⅲ、Ⅴ、ⅦおよびⅩⅡ）も行った。その結果、被験物質の投与による影響が雌雄ともに認められなかったため、その他の群については検査を行わなかった。交尾不成立および妊娠不成立の雌雄については、下垂体、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣および子宮を検査した。また、1000 mg/kg 群で認められた盲腸の拡張例について検査した。検査は、常法に従ってパラフィン切片を作製し、H-E 染色を施して鏡検した。また、精子形成サイクル検査については PAS 染色を行った。

## 2) 新生児に関する項目

### (1) 産児数、性比および外表観察

分娩完了の確認後速やかに各腹の産児数（生産児と死亡児の合計）、性別（肛門と生殖突起間距離の長短により判定）および口腔内を含む外表の異常を調べ、分娩率（%） $[(\text{総出産児数}/\text{着床数}) \times 100]$ を求めた。また、哺育 0 日の出産児の性比（雄出産児数/雌出産児数）の性比を算出した。

### (2) 一般状態・生児数

毎日、一般状態および生死を確認し、出生率（%） $[(\text{出産確認時生児数}/\text{総出産児数}) \times 100]$ および哺育 4 日生存率（%） $[(\text{哺育 4 日の生児数}/\text{出産確認時生児数}) \times 100]$ を算出した。

### (3) 体重

生児について、哺育 0 日（出生日）および 4 日（屠殺日）に、雌雄別に腹ごとの体重を測定し、1 匹当たりの平均体重を算出した。

### (4) 病理学検査

死亡例はその都度、生存例は哺育 4 日に二酸化炭素吸入により安楽死させ、胸部および腹部における主要器官について肉眼的に観察した。

## 5. 統計解析

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との有意差（危険率 5%以下）を、次の方法で検定した。なお、出産児に関するデータは、1 腹の平均を 1 標本とした。

### (1) パラメトリックデータ

多群間の比較については、Bartlett の分散検定を行った。分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnnett の検定法により対照群に対する各群の比較検定を行った。分散が一樣でない場合は、ノンパラメトリックデータに用いる検定法に従った（体重、体重増加量、摂餌量、器官重量、黄体数、着床数、交尾成立期間、妊娠期間、産児数、生児数、死亡児数）。

### (2) ノンパラメトリックデータ

多群間の比較については、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnnett の検定法により対照群と各群を比較した（着床率、出生率、分娩率、

性周期、新生児生存率)。2 群間の比較については、Mann-Whitney の U 検定を行った (精子形成サイクル検査)。

(3) カテゴリカルデータ

Fisher の直接確率法を用いた (一般状態の観察および病理学検査における異常例の発現率、交尾率、受胎率、出産率)。なお、兎動物の性比については  $\chi^2$  検定を用いた。また、病理組織学検査所見のうちグレード分けしたデータについては Mann-Whitney の U 検定を用いた。

## 結 果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態および死亡 (Tables 1, 2, Appendices 8~11)

被験物質投与各群とも、投与期間を通じて一般状態の変化および死亡は認められなかった。

#### 2) 体重 (Figures 1, 2, Tables 3, 4, Appendices 12, 13)

被験物質投与各群とも、体重および体重増加量に有意な変化は認められなかった。

#### 3) 摂餌量 (Figures 3, 4, Tables 5, 6, Appendices 14, 15)

被験物質投与各群とも、摂餌量に有意な変化は認められなかった。

#### 4) 剖検 (Tables 7, 8, Appendices 16, 17)

1000 mg/kg 群で盲腸の拡張が雌雄とも 12 匹中 7 匹に、また、雄の 1 匹で精巢上体に結節 (左側) が認められた。100 および 300 mg/kg 群では変化は認められなかった。

#### 5) 器官重量 (Tables 9, Appendices 18, 19)

被験物質投与各群とも、器官重量に有意な変化は認められなかった。

#### 6) 病理組織学検査 (Tables 10, 11, Appendices 16, 17)

被験物質投与各群とも、投与に起因する毒性変化は認められなかった。

前立腺の間質リンパ球浸潤が対照群で 3 例および 1000 mg/kg 群で 5 例認められた。剖検時に認められた盲腸の拡張例では粘膜や筋層の進展はみられたが、病的異常は認められなかった。同じく剖検時に 1000 mg/kg 群で認められた精巢上体の結節は、精子肉芽腫 (片側性) であった。

精子形成サイクル検査では、各検査ステージに有意な変化は認められなかった。

交尾が成立しなかった 100 mg/kg 群の 1 ペア (No. 019 と No. 519)、妊娠が成立しなかった 300 mg/kg 群の 1 ペア (No. 031 と No. 531) においては、生殖器系器官および下垂体に変化は認められなかった。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 親動物に及ぼす影響

#### (1) 性周期検査 (Table 12、Appendices 20, 21)

被験物質投与各群とも、対照群と比べて平均性周期に有意な変化は認められなかった。なお、交配開始後 2 日から 100 mg/kg 群で 1 匹 (No. 519) および 300 mg/kg 群で 1 匹 (No. 529) に発情休止期(V期)像の持続が認められ、No. 519 においては交配期間の最終日まで持続し、交尾は認められなかった。また、No. 529 では、交配開始後 12 日までV期像の持続が認められ、交配開始後 13 日に発情前期 (I 期) 像を示し、その翌日に交尾が確認された。

#### (2) 交尾率および受胎率 (Table 12、Appendix 22)

被験物質投与各群とも、交尾成立までに要する日数、交尾率および受胎率に有意な変化は認められなかった。

なお、100 mg/kg 群で 1 例 (No. 019 と No. 519 ペア) の交尾不成立、300 mg/kg 群で 1 例 (No. 531) の妊娠不成立が認められた。

#### (3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 12、Appendix 22)

被験物質投与各群とも、黄体数、着床数および着床率に有意な変化は認められなかった。

#### (4) 妊娠期間および出産率 (Table 12、Appendix 22)

被験物質投与各群とも、妊娠期間および出産率に有意な変化は認められなかった。

#### (5) 分娩および哺育状態 (Table 12、Appendix 22)

被験物質投与各群とも、分娩および哺育状態に異常は認められなかった。

### 2) 新生児に及ぼす影響

#### (1) 生存性および体重 (Table 13、Appendix 23)

被験物質投与各群とも、一腹当たりの総出産児数、生児数、体重、分娩率、出生率、生存率および性比に有意な変化は認められず、また、新生児の一般状態に異常は認められなかった。

#### (2) 病理学検査 (Table 14, 15、Appendices 24, 25)

外表検査では、100 mg/kg 群で矮小児が 2 例 (発現率 1.5%) 認められた以外は、

いずれの投与群においても異常は認められなかった。内臓検査では、いずれの投与群においても異常は認められなかった。また、内臓変異として胸腺の頸部残留を呈する児動物が対照群で 2 匹 (1.1%)、左臍動脈遺残を呈する児動物が対照群で 1 匹 (0.5%) および 300 mg/kg 群で 1 匹 (0.6%) 認められた。100 および 1000 mg/kg 群では、内臓変異を有する児動物は認められなかった。

## 考 察

### 1. 反復投与毒性について

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩の反復投与毒性については、ラットへの28日間反復経口投与毒性試験において、1000 mg/kg/dayの雌雄で単なる内容物の増加による盲腸の軽度な拡張がみられたが、明らかな毒性影響と考えられる変化は認められなかったと報告されている<sup>2)</sup>。

本試験においても同様に、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩の反復投与により、1000 mg/kg 群の雌雄で病理組織学変化を伴わない単なる内容物の増加による軽度な盲腸の拡張がみられたのみで、検査した各指標に毒性影響と判断される変化は認められなかった。

病理組織学変化を伴わない盲腸の拡張は、抗菌性物質や高分子化合物のラットやウサギなどの盲腸の大きな動物種への投与時にしばしば認められ、腸内細菌叢の乱れによる変化と考えられている。被験物質投与による盲腸拡張の発現機序については不明であるが、単なる盲腸内容物の増加による軽度な変化であり、下痢等の一般状態の変化や成長に対する影響は認められていないことから、生物学的にも毒性学的にも特に問題となるような変化ではないと考えられる<sup>2)</sup>。

なお、1000 mg/kg 群で認められた前立腺の間質リンパ球浸潤は対照群にも認められ、また、精巣上体における精子肉芽腫は1例のみの発現であり、いずれもラットにおける自然発生病変として発現する変化<sup>3)</sup>であることから、被験物質の投与とは無関係な偶発的所見と判断された。

### 2. 生殖発生毒性について

雌雄親動物の生殖能に対しては、検査した各指標に有意な変化は認められず、また、雌雄の生殖器官にも病理学的変化は認められなかった。

なお、100 mg/kg 群で認められた交尾不成立の1ペアおよび300 mg/kg 群で認められた交尾成立までに14日間を要した1例については、雌雄とも病理組織学検査で異常は認められず（交尾不成立例）、また、雌については交配開始後2日より発情休止期の持続が認められたことから、これらの原因は、雌が偽妊娠を起こしたことによるものと判断された。300 mg/kg 群で認められた妊娠不成立の1例については、雌雄の生殖器官

に病理組織学変化は認められず、また、1例のみの発現であることから、投与とは無関係な偶発的变化と判断された。

児の発生に対しても、検査した各指標に有意な変化は認められなかった。

なお、100 および 300 mg/kg 群で外表異常および内臓変異を呈する児動物が認められたが、いずれも低い発現率であり、用量相関的な増加傾向もないことから、自然発生的範疇<sup>4)</sup>の変化と判断された。

以上の結果から、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩の親動物への反復投与において、いずれの被験物質投与群においても毒性影響は認められなかったことから、反復投与毒性における無影響量 (NOEL) は雌雄とも 1000 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL は、親動物および児動物に対し、いずれの被験物質投与群においても変化が認められなかったことから、いずれも 1000 mg/kg/day と推定した。

## 文 献

- 1) “12394 の化学商品”，化学工業日報社，1994.
- 2) ██████████ 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリンジスルホン酸モノナトリウムのラットを用いた経口投与による 28 日間の反復投与毒性試験，化学物質毒性試験報告，**1**，489-498，1994.
- 3) 日本毒性病理学会編，“毒性病理組織学”，日本毒性病理学会，2000.
- 4) Morita, H., et al, (1987). Spontaneous malformations in laboratory animals. Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice, *Cong. Anom.*, **27**, 147-206.

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩の  
ラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

(試験番号：10-036)

## 最終報告書 添付資料A

(図・群別平均値表)

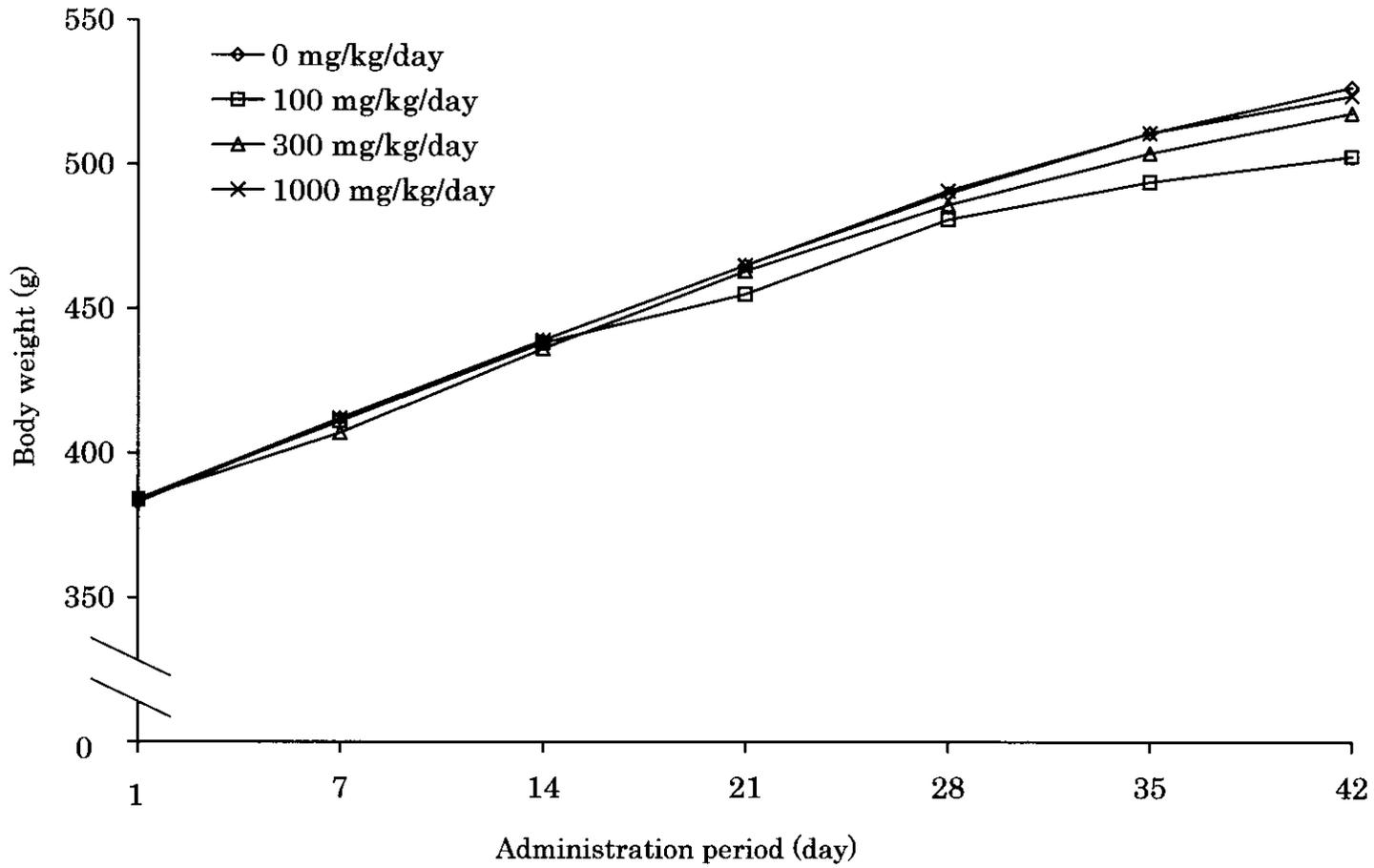
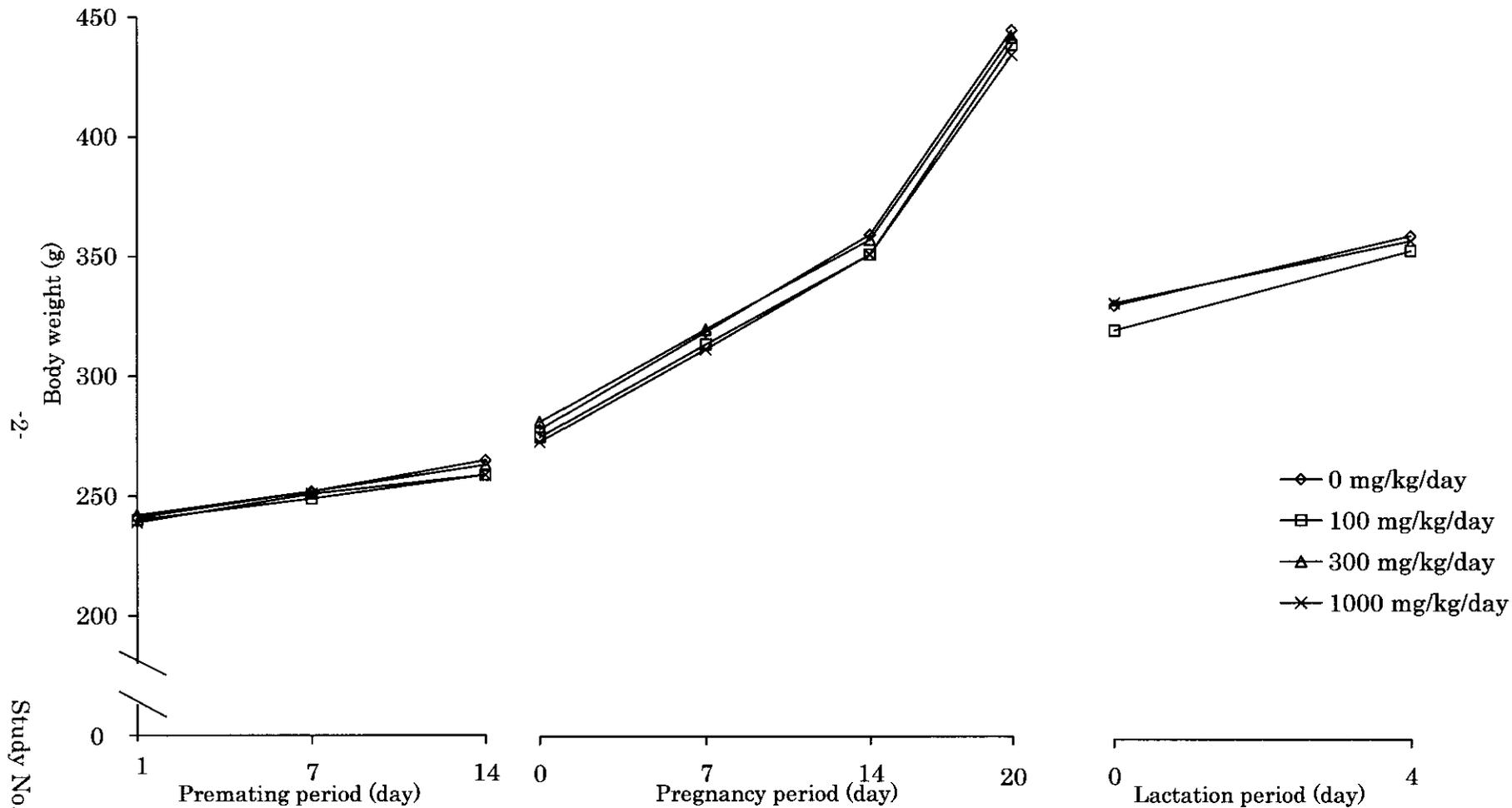


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test



Study No. 10-036

Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

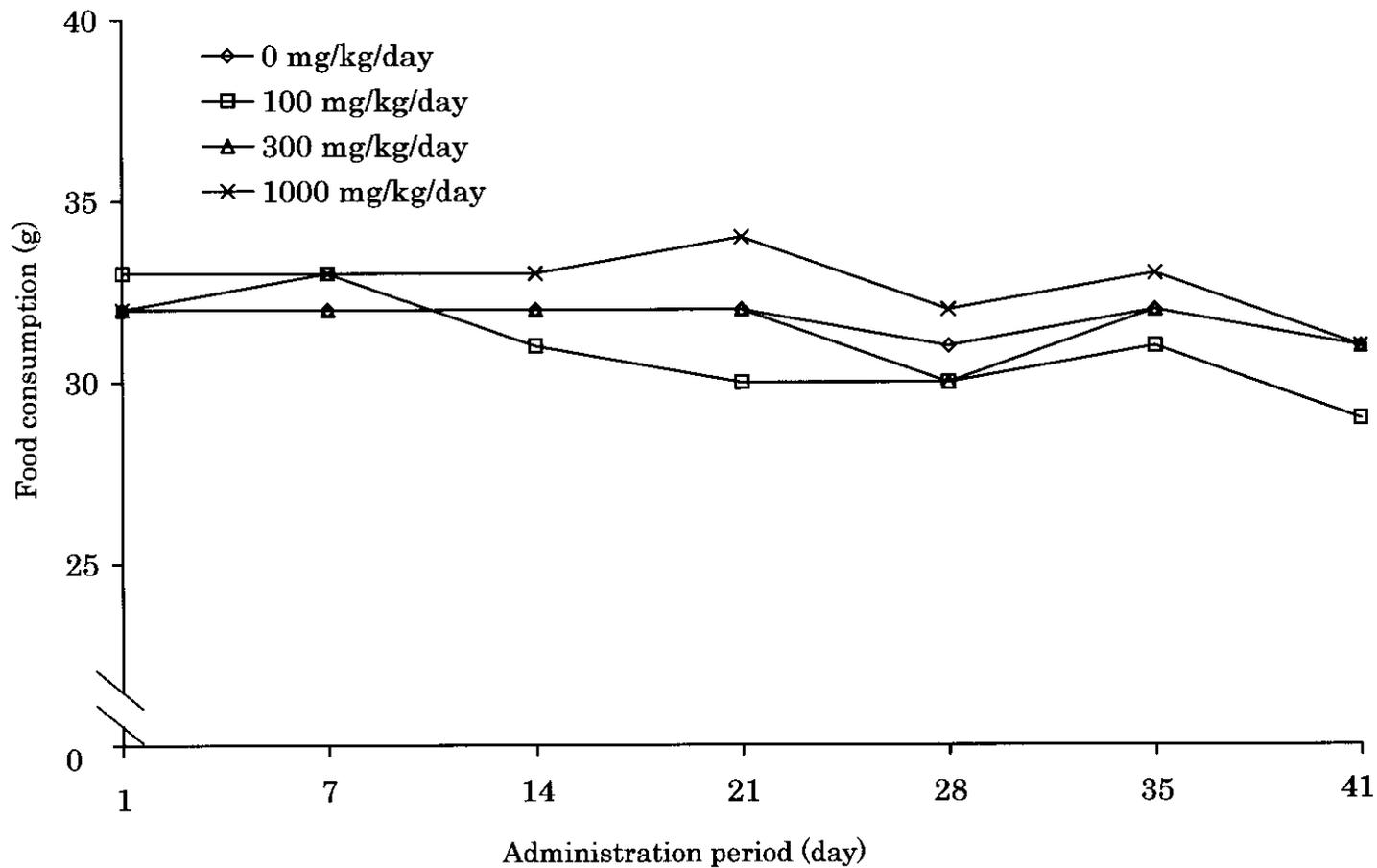


Fig. 3 Food consumption changes of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

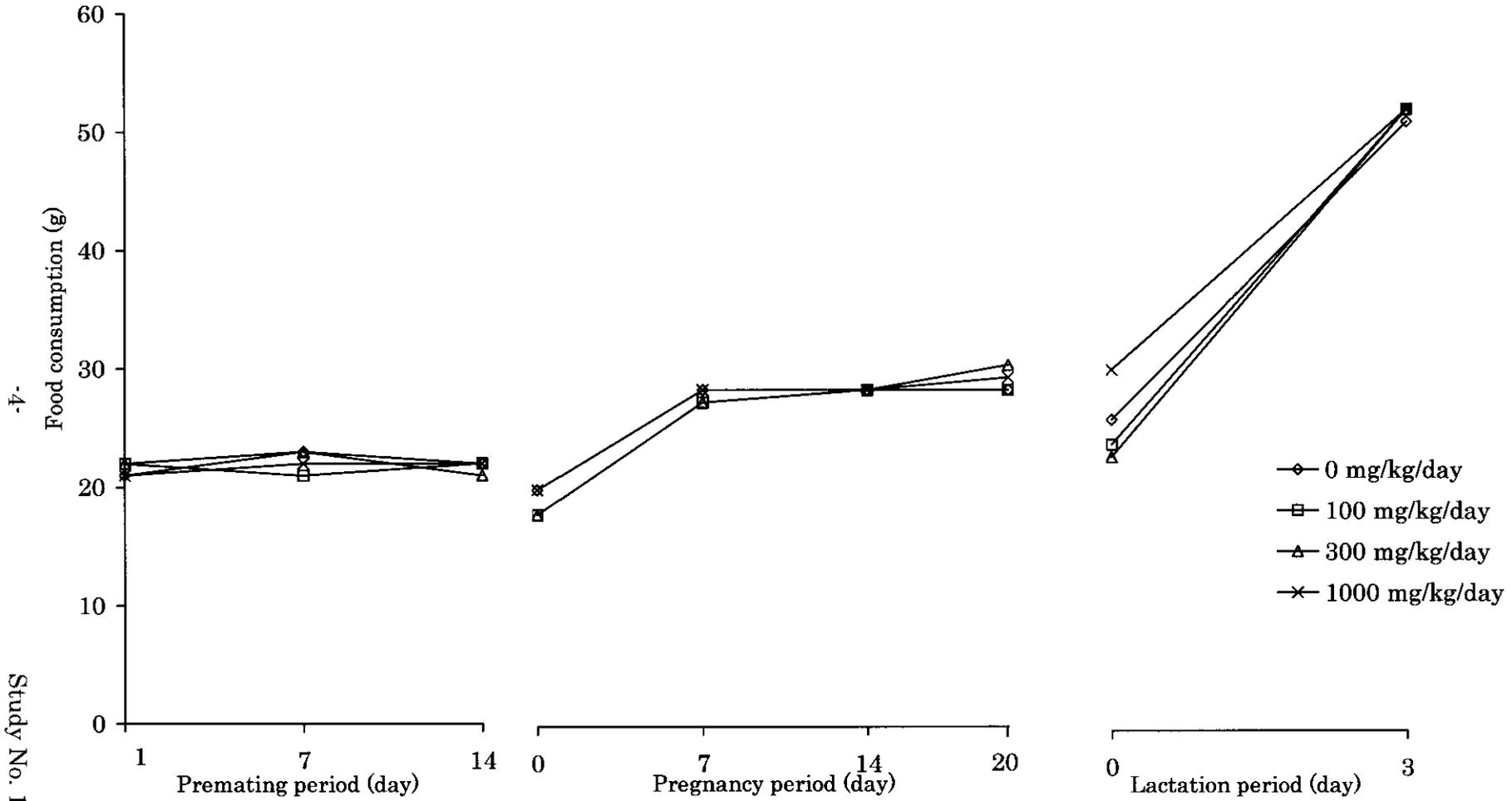


Fig. 4 Food consumption changes of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Table 1 General conditions and mortality of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

General conditions (Clinical signs)	Grade	Dose (mg/kg/day)	0		100		300		1000
			Fate	TK	TK	UC	TK	FP	TK
		No. of animals		12	11	1	11	1	12
Abnormality				0	0	0	0	0	0
		Mortality (%)		0	0		0		0

TK : Terminal killing. UC : Unsuccessful copulation.

FP : Failed to cause pregnancy.

**Table 2**      General conditions and mortality of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

General conditions (Clinical signs)	Grade	Dose (mg/kg/day)	0		100		300		1000
			Fate	TK	TK	UC	TK	NP	TK
		No. of animals		12	11	1	11	1	12
Abnormality				0	0	0	0	0	0
		Mortality (%)		0	0		0		0

TK : Terminal kill on day 5 after parturition. UC : Unsuccessful copulation.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Table 3 Body weights of male rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test (g)

Dose (mg/kg/day)	Day	Administration period						Gain 1~42	
		1	7	14	21	28	35		42
0		383	412	439	465	490	511	527	144
		± 16 (12)	± 16 (12)	± 23 (12)	± 21 (12)	± 24 (12)	± 24 (12)	± 28 (12)	± 24 (12)
100		384	411	438	455	481	494	503	119
		± 16 (12)	± 20 (12)	± 25 (12)	± 25 (12)	± 30 (12)	± 32 (12)	± 38 (12)	± 28 (12)
300		384	407	436	463	486	504	518	134
		± 15 (12)	± 16 (12)	± 21 (12)	± 25 (12)	± 27 (12)	± 30 (12)	± 32 (12)	± 20 (12)
1000		384	412	439	465	491	511	524	140
		± 12 (12)	± 16 (12)	± 19 (12)	± 20 (12)	± 21 (12)	± 24 (12)	± 25 (12)	± 17 (12)

Each value is expressed as mean ± S.D.  
(n) : No. of animals.

Table 4 Body weights of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Day	Premating period				Pregnancy period					Lactation period		
		1	7	14	Gain 1~14	0	7	14	20	Gain 0~20	0	4	Gain 0~4
0		241	252	265	24	273	312	351	433	160	324	352	29
		± 8 (12)	± 11 (12)	± 12 (12)	± 10 (12)	± 11 (12)	± 13 (12)	± 17 (12)	± 28 (12)	± 23 (12)	± 20 (12)	± 17 (12)	± 15 (12)
100		240	249	259	19	270	307	343	427	157	314	346	32
		± 12 (12)	± 13 (12)	± 11 (12)	± 8 (12)	± 11 (11)	± 11 (11)	± 12 (11)	± 14 (11)	± 14 (11)	± 14 (11)	± 17 (11)	± 12 (11)
300		242	252	263	21	276	313	349	430	154	324	347	24
		± 11 (12)	± 8 (12)	± 12 (12)	± 7 (12)	± 16 (11)	± 16 (11)	± 15 (11)	± 16 (11)	± 10 (11)	± 23 (11)	± 22 (11)	± 15 (11)
1000		239	251	259	19	268	305	343	423	155	325	350	25
		± 9 (12)	± 15 (12)	± 15 (12)	± 8 (12)	± 18 (12)	± 17 (12)	± 20 (12)	± 29 (12)	± 23 (12)	± 25 (12)	± 19 (12)	± 14 (12)

Each value is expressed as mean ± S.D.  
(n) : No. of animals.

Table 5 Food consumption of male rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test  
(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Day	Administration period						
		1	7	14	21	28	35	41
0		32	32	32	32	31	32	31
		± 3	± 3	± 4	± 2	± 4	± 3	± 3
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
100		33	33	31	30	30	31	29
		± 3	± 3	± 3	± 3	± 2	± 3	± 3
		(12)	(12)	(12)	(11) <sup>a</sup>	(11) <sup>a</sup>	(12)	(12)
300		32	32	32	32	30	32	31
		± 5	± 3	± 3	± 3	± 3	± 3	± 3
		(12)	(12)	(12)	(11) <sup>a</sup>	(11) <sup>a</sup>	(12)	(12)
1000		32	33	33	34	32	33	31
		± 3	± 3	± 4	± 3	± 2	± 3	± 3
		(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n) : No. of animals.

a : One animal could not measured because of mating.

Table 6

Food consumption of female rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Day	Premating period			Pregnancy period				Lactation period	
		1	7	14	0	7	14	20	0	3
0		21	23	22	19	27	27	27	25	49
		± 4 ± (12)	± 3 ± (12)	± 4 ± (12)	± 6 ± (12)	± 3 ± (12)	± 3 ± (12)	± 3 ± (12)	± 5 ± (12)	± 9 ± (12)
100		22	21	22	17	26	27	27	23	50
		± 3 ± (12)	± 2 ± (12)	± 3 ± (12)	± 3 ± (11)	± 2 ± (11)	± 2 ± (11)	± 4 ± (11)	± 9 ± (11)	± 6 ± (11)
300		22	23	21	17	26	27	29	22	50
		± 2 ± (12)	± 2 ± (12)	± 4 ± (12)	± 3 ± (11)	± 2 ± (11)	± 2 ± (11)	± 3 ± (11)	± 8 ± (11)	± 6 ± (11)
1000		21	22	22	19	27	27	28	29	50
		± 3 ± (12)	± 3 ± (12)	± 3 ± (12)	± 3 ± (12)	± 4 ± (12)	± 2 ± (12)	± 3 ± (12)	± 5 ± (12)	± 4 ± (12)

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n) : No. of animals.

Table 7 Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0		100		300		1000
				KD	No.of animals	KD	UC	KD	FP	KD
				12		11	1	11	1	12
Cecum	: Distension	+		0		0	0	0	0	7 **
Epididymis	: Nodule	++		0		0	0	0	0	1

KD : Killed by design after administration period.

UC : Unsuccessful copulation.

FP : Failed to cause pregnancy.

+ : Slight; ++ : Moderate.

\*\* : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 8 Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0	100		300		1000
				KD	KD	UC	KD	NP	KD
				No.of animals	11	1	11	1	12
Cecum	: Distension	+		0	0	0	0	0	7 **

KD : Killed by design after administration period.

UC : Unsuccessful copulation.

NP : Non pregnant.

+ : Slight.

\*\* : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 9 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	B.W. (g)	Prostate (g)	Seminal vesicle (g)	Testis (g)	Epididymis (g)
Absolute	0	12	490 ±25	0.72 ±0.12	2.33 ±0.36	3.45 ±0.22	1.37 ±0.07
	100	12	471 ±32	0.72 ±0.13	2.27 ±0.30	3.37 ±0.28	1.36 ±0.15
	300	12	482 ±28	0.67 ±0.12	2.63 ±0.38	3.41 ±0.24	1.45 ±0.14
	1000	12	491 ±23	0.68 ±0.19	2.44 ±0.30	3.49 ±0.20	1.47 ±0.18
Relative @	0	12	490 ±25	0.15 ±0.03	0.48 ±0.08	0.71 ±0.07	0.28 ±0.03
	100	12	471 ±32	0.16 ±0.03	0.48 ±0.08	0.72 ±0.07	0.29 ±0.03
	300	12	482 ±28	0.14 ±0.02	0.55 ±0.10	0.71 ±0.04	0.30 ±0.03
	1000	12	491 ±23	0.14 ±0.04	0.50 ±0.06	0.71 ±0.04	0.30 ±0.04

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

Table 10-1 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0		100		300		1000
				Fate	KD	KD	UC <sup>a</sup>	KD	FP <sup>a</sup>	KD
					12	11	1	11	1	12
Prostate	: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	+		3	#	0	#	0		3
		++		0	#	0	#	0		2
Epididymis	: Spermatic granuloma	+		0	#	0	#	0		1

KD : Killed by design after administration period.

Organs of the cecum, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined for males of control and 1000 mg/kg groups.

a : Organs of the pituitary, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

UC : Unsuccessful copulation.

FP : Failed to cause pregnancy.

+ : Slight; ++ : Moderate.

# : Not examined.

Table 10-2 The number of cells in seminiferous epithelia assessed by the individual examination in male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	No. of animals		Stage II-III			Stage V			Stage VII			Stage X II	
			G	P	T	G	P	T	G	R/P	T	G	Z/P
0	12	Mean	0.43	1.87	6.14	0.62	1.84	5.97	0.06	3.03	6.17	0.06	4.24
		S.D.	0.04	0.09	0.31	0.05	0.15	0.20	0.01	0.19	0.39	0.01	0.15
1000	12	Mean	0.42	1.81	5.89	0.60	1.82	6.11	0.06	3.05	6.23	0.06	4.30
		S.D.	0.05	0.09	0.21	0.04	0.09	0.19	0.01	0.13	0.29	0.01	0.26

G : spermatogonia.  
P : pachytene spermatocyte.  
R : preleptotene spermatocyte.  
Z : zygotene spermatocyte.  
T : round spermatid.

Table 11 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	Dose (mg/kg/day)	0		100		300		1000
				Fate	KD	KD	UC <sup>a</sup>	KD	NP <sup>a</sup>	KD
				No.of animals	12	11	1	11	1	12
: Abnormality					0	#	0	#	0	0

KD : Killed by design after administration period.

Organs of the cecum, ovary and uterus were examined for females of control and 1000 mg/kg groups.

a : Organs of the pituitary, ovary and uterus were examined.

UC : Unsuccessful copulation.

NP : Non pregnant.

# : Not examined.

Table 12 Reproduction results of rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0			100			300			1000		
Estrous cycle (days, Mean $\pm$ S.D.)	4.1	$\pm$	0.3 (0/12) <sup>a</sup>	4.1	$\pm$	0.2 (0/12) <sup>a</sup>	4.2	$\pm$	0.4 (0/12) <sup>a</sup>	4.3	$\pm$	0.6 (0/12) <sup>a</sup>
No. of pairs mated	12			12			12			12		
No. of pairs with successful copulation	12			11			12			12		
Copulation index (%)	100.0			91.7			100.0			100.0		
Pairing days until copulation (days, Mean $\pm$ S.D.)	2.7	$\pm$	1.1	2.5	$\pm$	0.9	3.4	$\pm$	3.5	2.8	$\pm$	1.1
No. of pregnant females	12			11			11			12		
Fertility index (%)	100.0			100.0			91.7			100.0		
No. of corpora lutea (Mean $\pm$ S.D.)	16.1	$\pm$	2.2	17.0	$\pm$	1.7	16.3	$\pm$	0.9	15.9	$\pm$	1.6
No. of implantation sites (Mean $\pm$ S.D.)	15.2	$\pm$	3.8	16.4	$\pm$	1.5	15.6	$\pm$	1.4	15.5	$\pm$	1.6
Implantation index (% , Mean $\pm$ S.D.)	93.1	$\pm$	16.7	96.5	$\pm$	5.5	96.0	$\pm$	5.8	97.5	$\pm$	4.0
No. of pregnant females with parturition	12			11			11			12		
Gestation length (days, Mean $\pm$ S.D.)	22.3	$\pm$	0.5	22.4	$\pm$	0.5	22.2	$\pm$	0.4	22.6	$\pm$	0.5
No. of pregnant females with live pups	12			11			11			12		
Gestation index (%)	100.0			100.0			100.0			100.0		
No. of pregnant females with live pups on day 4	12			11			11			12		

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)  $\times$ 100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)  $\times$ 100.

Gestation index = (No. of females with live pups/No. of pregnant females)  $\times$ 100.

a : (No. of females with disorder of estrous cycle / No. of females).

Table 13 Litter results of rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	100	300	1000
No. of pups born	14.7 ± 3.8	15.4 ± 1.9	14.8 ± 1.7	15.0 ± 1.1
Delivery index (%)	96.7 ± 4.8	93.8 ± 6.5	94.7 ± 5.5	97.1 ± 3.8
No. of pups alive on day 0 of lactation				
Total	14.7 ± 3.8	15.2 ± 1.9	14.8 ± 1.7	14.9 ± 1.2
Male	7.0 ± 3.1	6.5 ± 1.7	7.5 ± 2.5	7.3 ± 1.7
Female	7.7 ± 2.2	8.6 ± 1.6	7.3 ± 2.2	7.7 ± 1.6
Live birth index (%)	100.0 ± 0.0	98.9 ± 2.5	100.0 ± 0.0	99.4 ± 2.0
Sex ratio(Male/Female)	0.91	0.76	1.04	0.94
No. of pups alive on day 4 of lactation				
Total	14.6 ± 3.8	14.7 ± 2.2	14.6 ± 1.6	14.8 ± 1.3
Male	6.9 ± 3.1	6.4 ± 1.9	7.5 ± 2.5	7.2 ± 1.7
Female	7.7 ± 2.2	8.4 ± 1.5	7.1 ± 2.2	7.7 ± 1.6
Viability index (%)	99.5 ± 1.8	96.7 ± 5.4	98.9 ± 2.5	99.4 ± 1.9
Body weight of live pups (g)				
on day 0				
Male	6.9 ± 0.8	7.0 ± 0.7	6.9 ± 0.6	7.2 ± 0.5
Female	6.6 ± 0.7	6.5 ± 0.6	6.6 ± 0.5	6.8 ± 0.5
on day 4				
Male	11.3 ± 1.9	11.0 ± 1.5	10.9 ± 1.1	11.7 ± 0.9
Female	10.8 ± 1.8	10.6 ± 1.5	10.4 ± 1.2	10.9 ± 0.8

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.

Sex ratio = Total number of male pups/Total number of female pups.

Each value is expressed as Mean±S.D.,except sex ratio.

Table 14 External findings of pups obtained from pregnant rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	100	300	1000
No. of pups examined	176	169	163	180
No. of pups with external malformations <sup>#</sup>	0 (0)	2 (1.5±5.0)	0 (0)	0 (0)
Dwarf	0 (0)	2 (1.5±5.0)	0 (0)	0 (0)

# : No. of pups (Mean±S.D. of individual litter percentages).

Table 15 Visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	100	300	1000
No. of pups examined	176	166	163	180
No. of pups with visceral malformations	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No. of pups with visceral variations	3 (1.6±2.9)	0 (0)	1 (0.6±1.9)	0 (0)
Thymic remnant in neck	2 (1.1±2.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Persistent left umbilical artery	1 (0.5±1.7)	0 (0)	1 (0.6±1.9)	0 (0)

( ) : No. of pups (Mean±S.D. of individual litter percentages).

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩の  
ラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

(試験番号：10-036)

## 最終報告書 添付資料B

(個別別表等)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

## Appendix 1 Test item characterization

### 被験物質の特性

名称： 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩

(英名： 4-Amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt)

別名： 1-Amino-8-naphthol-3,6-disulfonic acid monosodium salt,  
Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate

CAS 番号： 5460-09-3

ロット番号： HGB01

純度： 84.8%、[不純物として、硫酸塩 3.0%、乾燥減量 5.2%、成分名不明：2.3%のもの 1 成分と 1%未満のもの 10 成分、残り不明を含む、東京化成工業株式会社（東京都中央区日本橋 4-10-2）からの情報]

入手先： [REDACTED] から試薬を購入

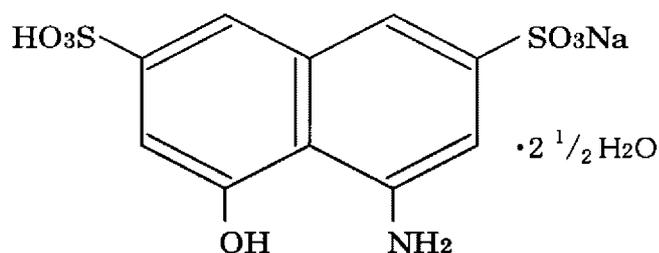
入手日・量： 平成 22 年 6 月 9 日 (1500 g)

物性等：

化学名 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩

分子式  $C_{10}H_8NNaO_7S_2 \cdot xH_2O$

構造式



分子量 341.29 (無水酸として)

性状 (常温) 灰褐色固体

溶解性 熱水に可溶

安定性： 安定〔実験終了後、残余被験物質を分析（2010年11月24日：  
電位差滴定法：中和滴定）した結果、純度は85.0%  
であり、安定であったことを確認した。〕

保管条件： 冷暗所（2～6℃）、密栓

## Appendix 2 Stability of the test article in the dosing solutions

### 被験物質の投与形態での安定性

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩のラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験を実施するに当たり、被験物質の投与形態での安定性を調べるため、媒体としてメチルセルロース（和光純薬工業株式会社、100 cp、ロット番号 EWK3873）の 1%水溶液（局方精製水、共栄製薬株式会社）を用いて 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩（ロット番号：YOCLB）の 0.2%濃度および 20%濃度の懸濁液を調製し、調製直後および調製後冷所（2～6℃）、遮光下で 7 日保存後、それぞれ室温・遮光下で 1 日保存したものについて上、中および下層よりサンプリングし、濃度を分析（電位差滴定法）した。得られた結果は、次表に示す。

調製濃度 (%)	分析時点	分析値 (%)				変動係数 (%)
		上層	中層	下層	平均値	
0.2	調製直後	0.19	0.18	0.19	0.19	3.0
	8 日後	0.20	0.19	0.19	0.19	3.0
20	調製直後	19.8	19.6	19.7	19.7	0.5
	8 日後	19.6	19.4	19.3	19.4	0.8

以上の結果から、メチルセルロースの 1%水溶液に懸濁した 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩は、冷所（2～6℃）で 7 日保存後、室温・遮光下で 1 日保存した場合において、均一、かつ安定であることが確認された。

### Appendix 3 Analysis of concentrations of the test article in the dosing solutions

#### 投与液中の被験物質濃度の確認

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩のラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験のための被験物質投与液について、所定の濃度で調製されていることを確認するため、初回に調製された4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタリン=ジスルホン酸モノナトリウム塩の精製水による溶液（100 mg/kg 群用：20 mg/mL）および懸濁液（300 mg/kg 群用：60 mg/mL および 1000 mg/kg 群用：200 mg/mL）について、それぞれ3反復分析（電位差滴定法）した。得られた結果は、次表に示す。

調製濃度 (mg/mL)	分析値 (mg/mL)			
	上層	中層	下層	平均値
20	19.7	19.7	19.8	19.7
60	59.0	58.6	58.6	58.7
200	218.9	223.7	216.6	219.7

以上の結果から、被験物質投与液は、所定の濃度で調製されていることが確認された。

## Result of temperature and relative humidity at animal room No.7

Date	Temperature(°C)	Humidity(%)	Note
2010/9/9	21.1 - 23.0	54 - 56	Arrival of animals
2010/9/10	22.5 - 23.6	53 - 56	
2010/9/11	22.8 - 24.0	50 - 56	
2010/9/12	23.3 - 24.1	52 - 54	
2010/9/13	23.4 - 24.4	51 - 54	Start of the examination of estrous cycle
2010/9/14	23.5 - 24.1	52 - 54	
2010/9/15	23.1 - 23.7	53 - 55	
2010/9/16	22.9 - 23.0	54 - 56	
2010/9/17	22.4 - 23.8	53 - 58	
2010/9/18	22.8 - 23.8	53 - 56	
2010/9/19	23.0 - 23.9	53 - 56	
2010/9/20	23.1 - 23.9	54 - 56	
2010/9/21	23.0 - 23.9	52 - 57	
2010/9/22	23.1 - 24.3	52 - 57	Grouping
2010/9/23	23.0 - 23.8	55 - 58	Start of administration
2010/9/24	22.3 - 23.2	54 - 57	
2010/9/25	22.1 - 23.3	56	
2010/9/26	22.1 - 23.4	50 - 60	
2010/9/27	22.3 - 23.3	58 - 59	
2010/9/28	22.3 - 23.6	56 - 59	
2010/9/29	22.3 - 23.6	56 - 60	
2010/9/30	22.4 - 23.0	57 - 59	
2010/10/1	22.3 - 23.3	56 - 59	
2010/10/2	22.3 - 24.0	56 - 61	
2010/10/3	22.5 - 23.7	56 - 57	
2010/10/4	22.6 - 23.5	58 - 59	
2010/10/5	22.4 - 24.1	54 - 59	
2010/10/6	22.4 - 24.0	55 - 59	
2010/10/7	22.3 - 23.6	57 - 59	Start of mating
2010/10/8	22.6 - 23.5	53 - 56	
2010/10/9	22.4 - 23.2	57 - 58	
2010/10/10	22.5 - 23.5	56 - 59	
2010/10/11	22.4 - 23.8	55 - 60	
2010/10/12	22.6 - 23.6	55 - 59	
2010/10/13	22.6 - 23.9	56 - 59	
2010/10/14	22.5 - 23.7	57 - 58	
2010/10/15	22.4 - 23.3	56 - 58	
2010/10/16	22.4 - 23.6	55 - 57	

## Result of temperature and relative humidity at animal room No.7

Date	Temperature(°C)	Humidity(%)	Note
2010/10/17	22.5 - 23.2	56 - 58	
2010/10/18	22.2 - 23.5	57 - 59	
2010/10/19	22.2 - 23.7	57 - 59	
2010/10/20	22.2 - 23.4	57 - 59	
2010/10/21	22.8 - 24.7	53 - 58	End of mating
2010/10/22	22.2 - 23.2	56 - 57	
2010/10/23	22.8 - 23.2	56 - 59	
2010/10/24	22.1 - 23.7	57 - 58	
2010/10/25	22.7 - 23.7	58 - 59	
2010/10/26	22.4 - 23.4	56 - 58	
2010/10/27	21.9 - 23.1	55 - 59	
2010/10/28	22.0 - 23.9	55 - 59	
2010/10/29	24.7 - 24.8	50 - 53	
2010/10/30	22.0 - 22.3	59	
2010/10/31	22.0 - 22.5	59 - 60	
2010/11/1	22.8 - 24.5	55 - 59	
2010/11/2	22.4 - 24.3	56 - 57	
2010/11/3	22.8 - 24.2	58 - 60	
2010/11/4	22.6 - 23.9	53 - 57	Necropsy of males Necropsy of females
2010/11/5	22.1 - 23.4	54 - 57	↓
2010/11/6	22.4 - 22.7	55	
2010/11/7	22.1 - 22.3	54 - 57	
2010/11/8	22.2 - 22.4	53 - 54	
2010/11/9	21.9 - 22.5	53 - 55	
2010/11/10	21.9 - 22.6	52 - 56	
2010/11/11	22.1 - 22.5	54 - 55	
2010/11/12	22.1 - 22.7	56 - 58	
2010/11/13	22.2 - 22.7	54 - 56	
2010/11/14	22.2 - 22.7	56 - 58	
2010/11/15	22.1 - 22.3	55 - 57	
2010/11/16	21.9 - 22.4	54 - 56	
2010/11/17	21.9 - 22.4	55 - 58	Necropsy of female

## Appendix 5-1 Analysis of contaminants in animal feed

### TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences  
IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nishinbashi-Hakozaki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN  
TEL 03(5663)9581 FAX 03(5663)9580

Date : June 28, 2010

#### CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K  
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100652  
Date of Application : June 7, 2010  
Date of Examination : June 7, 2010 ~ June 28, 2010  
Examination No. : 261006-0010

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on June 7, 2010, we herewith report as follows :

#### RESULTS

Aflatoxin B <sub>1</sub> .....	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin B <sub>2</sub> .....	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G <sub>1</sub> .....	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G <sub>2</sub> .....	not detected	(detection limit 5 ppb)
Arsenic(As) .....	0.09 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Lead(Pb) .....	0.2 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Cadmium(Cd) .....	0.07 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Chromium(Cr) .....	0.5 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Mercury(Hg) .....	0.01 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Polychlorinatedbiphenyl(PCBs) .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Total BHC* <sup>1</sup> .....	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Parathion .....	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Malathion .....	0.08 ppm	(detection limit 0.05 ppm)
Total DDT* <sup>2</sup> .....	not detected	(detection limit 0.05 ppm)

\*<sup>1</sup> Expressed as total amounts of  $\alpha$ -BHC,  $\beta$ -BHC,  $\gamma$ -BHC and  $\delta$ -BHC

\*<sup>2</sup> Expressed as total amounts of *op'*-DDT, *pp'*-DDT, *op'*-DDD, *pp'*-DDD, *op'*-DDE and *pp'*-DDE

continued.

## Appendix 5-2 Analysis of contaminants in animal feed

### TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences

NAKAS-HANCOANI BLDG. 44-1 Minnetashi Nakozaki-cho Inao-Ku Tokyo 103-0045 JAPAN

TEL: 03(5663)9121 FAX: 03(5663)9697

Heptachlor .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Dieldrin .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Aldrin .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
N-Nitrosodiethylamine .....	not detected	(detection limit 10 ppb)
N-Nitrosodimethylamine .....	not detected	(detection limit 10 ppb)



Director  
Institute for Food and Environment Sciences  
TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Appendix 5-3 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environmental Sciences  
IMAE-HANCOCKY BLDG. 4F, 1-1-1 Nishimeshi, Nakano-City, Chuo-Ku, Tokyo 100-0016, JAPAN  
TEL. 03(5663)9661 FAX. 03(5663)9665

Date : June 28, 2010

CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K  
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100652  
Date of Application : June 7, 2010  
Date of Examination : June 7, 2010 ~ June 28, 2010  
Examination No. : 261006-0011

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on June 7, 2010, we herewith report as follows :

RESULT

Selenium(Se) ..... 0.4 ppm (detection limit 0.1 ppm)



Director  
Institute for Food and Environment Sciences  
TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

**NOSAN**

DATE Jun 7, 2010

MICROBIOLOGICAL INSPECTION

Customer  
RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE  
IN BIOCHEMISTRY AND TOXICOLOGY  
Sample Designation  
LABO MR STOCK  
Lot No.20100652

S.P.C. .... 7.9×10<sup>3</sup> CFU/g  
Coliform Group ..... Negative  
Salmonella ..... Negative  
Molds ..... <20 CFU/g

NOSAN CORPORATION  
R & D Center  
Veterinary & Hygiene Service Group  
5246 TAKURA, TSUKUBASHI, 300-2615 JAPAN

  
Director

## Appendix 5-5 Analysis of contaminants in animal feed

### TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences  
IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbashi hakozaiki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN  
TEL 03(3663)9681 FAX 03(3663)9685

Date : September 9, 2010

#### CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K  
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100861  
Date of Application : August 19, 2010  
Date of Examination : August 19, 2010 ~ September 9, 2010  
Examination No. : 261008-0044

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on August 19, 2010, we herewith report as follows :

#### RESULTS

Aflatoxin B <sub>1</sub> .....	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin B <sub>2</sub> .....	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G <sub>1</sub> .....	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G <sub>2</sub> .....	not detected	(detection limit 5 ppb)
Arsenic(As) .....	0.28 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Lead(Pb) .....	0.3 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Cadmium(Cd) .....	0.03 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Chromium(Cr) .....	0.8 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Mercury(Hg) .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Polychlorinatedbiphenyl(PCBs) .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Total BHC* <sup>1</sup> .....	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Parathion .....	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Malathion .....	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Total DDT* <sup>2</sup> .....	not detected	(detection limit 0.05 ppm)

\*<sup>1</sup> Expressed as total amounts of  $\alpha$ -BHC,  $\beta$ -BHC,  $\gamma$ -BHC and  $\delta$ -BHC

\*<sup>2</sup> Expressed as total amounts of *op*'-DDT, *pp*'-DDT, *op*'-DDD, *pp*'-DDD, *op*'-DDE and *pp*'-DDE

continued.

Appendix 5-6 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences

IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbashi hakozaki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN

TEL 03(3663)9681 FAX 03(3663)9685

Heptachlor .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Dieldrin .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Aldrin .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
N-Nitrosodiethylamine .....	not detected	(detection limit 10 ppb)
N-Nitrosodimethylamine .....	not detected	(detection limit 10 ppb)



Director  
Institute for Food and Environment Sciences  
TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Appendix 5-7 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences  
IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbashi hakozaki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN  
TEL 03(3663)9681 FAX 03(3663)9685

Date : September 9, 2010

CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K  
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100861  
Date of Application : August 19, 2010  
Date of Examination : August 19, 2010 ~ September 9, 2010  
Examination No. : 261008-0045

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on August 19, 2010, we herewith report as follows :

RESULT

Selenium(Se) ..... 0.4 ppm (detection limit 0.1 ppm)



Director  
Institute for Food and Environment Sciences  
TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

**NOSAN**

DATE Aug 18, 2010

**MICROBIOLOGICAL INSPECTION**

**Customer**

**RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE  
IN BIOCHEMISTRY AND TOXICOLOGY**

**Sample Designation**

**LABO MR STOCK**

**Lot No.20100861**

S.P.C. .... 6.5×10<sup>3</sup> CFU/g  
Coliform Group ..... Negative  
Salmonella ..... Negative  
Molds ..... <20 CFU/g

**NOSAN CORPORATION**

**R & D Center**

**Veterinary & Hygiene Service Group**

**5246 TAKURA, TSUKUBASHI, 300-2615 JAPAN**



**Director**

Appendix 5-9 Analysis of contaminants in animal feed

TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Institute for Food and Environment Sciences  
IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbashi hakozaiki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN  
TEL 03(3663)9681 FAX 03(3663)9685

Date : October 5, 2010

CERTIFICATE

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K  
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100957  
Date of Application : September 10, 2010  
Date of Examination : September 10, 2010 ~ October 5, 2010  
Examination No. : 261009-0013

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name  
on September 10, 2010, we herewith report as follows :

RESULTS

Aflatoxin B <sub>1</sub>	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin B <sub>2</sub>	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G <sub>1</sub>	not detected	(detection limit 5 ppb)
Aflatoxin G <sub>2</sub>	not detected	(detection limit 5 ppb)
Arsenic(As)	0.16 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Lead(Pb)	0.3 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Cadmium(Cd)	0.08 ppm	(detection limit 0.01 ppm)
Chromium(Cr)	0.7 ppm	(detection limit 0.1 ppm)
Mercury(Hg)	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Polychlorinatedbiphenyl(PCBs)	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Total BHC* <sup>1</sup>	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Parathion	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Malathion	not detected	(detection limit 0.05 ppm)
Total DDT* <sup>2</sup>	not detected	(detection limit 0.05 ppm)

\*<sup>1</sup> Expressed as total amounts of  $\alpha$ -BHC,  $\beta$ -BHC,  $\gamma$ -BHC and  $\delta$ -BHC

\*<sup>2</sup> Expressed as total amounts of  $op'$ -DDT,  $pp'$ -DDT,  $op'$ -DDD,  $pp'$ -DDD,  
 $op'$ -DDE and  $pp'$ -DDE

continued.

Appendix 5-10 Analysis of contaminants in animal feed

**TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION**

Institute for Food and Environment Sciences

IMAS-HAKOZAKI BLDG 44-1 Nihonbashi nakozaki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN

TEL 03(3663)9681 FAX 03(3663)9685

Heptachlor .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Dieldrin .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
Aldrin .....	not detected	(detection limit 0.01 ppm)
N-Nitrosodiethylamine .....	not detected	(detection limit 10 ppb)
N-Nitrosodimethylamine .....	not detected	(detection limit 10 ppb)



Director  
Institute for Food and Environment Sciences  
TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

Appendix 5-11 Analysis of contaminants in animal feed

**TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION**

Institute for Food and Environment Sciences  
IMAS-HAKOZAKI BLDG. 44-1 Nihonbashi nakozaki-cho Chuo-Ku Tokyo 103-0015 JAPAN  
TEL 03(3863)9681 FAX 03(3863)9685

Date : October 5, 2010

**CERTIFICATE**

Applicant : NIHON NOSAN KOGYO K.K  
Samples : LABO MR-STOCK, Lot No.20100957  
Date of Application : September 10, 2010  
Date of Examination : September 10, 2010 ~ October 5, 2010  
Examination No. : 261009-0014

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above mentioned name on September 10, 2010, we herewith report as follows :

**RESULT**

Selenium(Se) ..... 0.3 ppm (detection limit 0.1 ppm)



Director  
Institute for Food and Environment Sciences  
TOKYO KENBIKYO-IN FOUNDATION

**NOSAN**

DATE Sep 13, 2010

**MICROBIOLOGICAL INSPECTION**

**Customer**

**RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE  
IN BIOCHEMISTRY AND TOXICOLOGY**

**Sample Designation**

**LABO MR STOCK**

**Lot No.20100957**

S.P.C. .... <300 CFU/g  
Coliform Group ..... Negative  
Salmonella ..... Negative  
Molds ..... <20 CFU/g

**NOSAN CORPORATION**

**R & D Center**

**Veterinary & Hygiene Service Group**

**5246 TAKURA, TSUKUBASHI, 300-2615 JAPAN**



**Director**

Appendix 6-1 Analysis of contaminants in wood chips for mating nest



分析レポートコード AR-10-JP-001104-01



ユーロフィンズオーダーコード EUJPTO-00000851

報告日 22.10.2010

日本チヤールス

受領



分析報告書

サンプルコード: 257-2010-10000007 分析 05.10.2010 - 19.10.2010  
 顧客コード: ホワイトブレード

分析	結果	単位	定量限界
J8312 ヒ素 (Asとして) ヒ素	<0.10	ppm	0.10
J8308 カドミウム カドミウム	0.28	ppm	0.01
J8306 鉛 鉛	0.14	ppm	0.05
JCHG2 総水銀 総水銀	<0.005	ppm	0.005
JJ006 アフラトキシン B1, B2, G1, G2 アフラトキシン B1	0.1	ppb	0.1
アフラトキシン B2	<0.1	ppb	0.1
アフラトキシン G1	<0.1	ppb	0.1
アフラトキシン G2	<0.1	ppb	0.1
UMUP8 酵母およびカビ カビ	< 10	cfu/g	<10
UMUDN 一般細菌数 (生菌数) 一般細菌数 (30° C)	< 10	cfu/g	<10
UMTK5 サルモネラ サルモネラ	陰性	/25 g	
UMULP 大腸菌 大腸菌	陰性	cfu/g	

報告結果の再生については分析所の許可が必要となります。報告結果は、分析したサンプルのみに適用されます。  
 Eurofins Analytics K.K Nisse Keihin-Jima Center New Bldg. 2F 3-5-5 Keihin-Jima Ota-Ku 143-0003 Tokyo - JAPAN  
 ページ 1/2

Appendix 6-2 Analysis of contaminants in wood chips for mating nest



分析レポートコード AR-10-JP-001104-01



ユーロフィンズオーダーコード EUJPTO-00000851

**J3246 乾燥減量**

含水量 9.5 % 0.1

**SP001 ヒレスロイドを含む有機塩素系農薬**

γ-BHC (リンデン)	<0.001 ppm	0.001
DDT 及び代謝物 (総計)	<0.01 ppm	
DDT, p,p'-	<0.001 ppm	0.001
DDT, o,p'-	<0.001 ppm	0.001
DDE, p,p'-	<0.002 ppm	0.002
DDE, o,p'-	<0.002 ppm	0.002
DDD, p,p'-	<0.002 ppm	0.002
DDD, o,p'-	<0.002 ppm	0.002
エンドリン	<0.002 ppm	0.002
ディルドリン	<0.001 ppm	0.001
アルドリン	<0.001 ppm	0.001
ヘプタクロル	<0.001 ppm	0.001

**SP004 有機リン系農薬**

パラチオン	<0.01 ppm	0.01
ダイアジノン	<0.01 ppm	0.01
マラチオン (マラソン)	<0.01 ppm	0.01
パラチオンメチル	<0.01 ppm	0.01

**SP103 多環化 ヒフエニル**

7 PCB 測定総計	<0.07 ppm	
PCB IUPAC 28	<0.01 ppm	0.01
PCB IUPAC 52	<0.01 ppm	0.01
PCB IUPAC 101	<0.01 ppm	0.01
PCB IUPAC 118	<0.01 ppm	0.01
PCB IUPAC 138	<0.01 ppm	0.01
PCB IUPAC 153	<0.01 ppm	0.01
PCB IUPAC 180	<0.01 ppm	0.01



Chemistry Customer Services Manager

報告結果の再生については分析所の許可が必要となります。報告結果は、分析したサンプルのみに適用されます。  
Eurofins Analytics K.K Nittsu Keihin-Jima Center New Bldg. 2F 3-5-5 Keihin-Jima Ota-Ku 143-0003 Tokyo - JAPAN  
ページ 2/2

## Appendix 7 Analysis of contaminants in drinking water

### Analytical Certificate of Tap water

Issue No. D-100194

Date: 2. Aug. 2010

Messrs. **RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE IN BIOCHEMISTRY & TOXICOLOGY**

**TOKYO ANAL-SERVICE Co.,Ltd**  
 8-Chome, Sai Edogawa-ku Tokyo  
 Tel: 03-5622-0388  
 Registered under Art. 20.3 of the waterworks law  
 Registered under Art. 327  
 (Analysing Laboratory in buil. facilities)  
 Director of analysis : XXXXXXXXXX  
 Sampling by : XXXXXXXXXX

Sample: Tap water  
 Sampling spot: Clean room  
 Date of sampling: 20. Jul. 2010  
 Purpose of analysis: Suitability inspection according to the  
 Criteria of the Waterworks Law  
 (15Items + 12Sterilizing byproducts)

No.	Items	Unit	Results	Criteria
1	Bacteria	count/ml	0	less than 100
2	Coliform count	—	Non-detected	Non-detected
3	Nitrogen (as nitrite&nitrate)	mg/l	1.2	less than 10
4	Chloride ion	mg/l	9.5	less than 200
5	Organic substance (Total Organic Carbon)	mg/l	0.5	less than 3
6	p H	—	7.5	5.8~8.6
7	Taste	—	normal	Not abnormal
8	Odor	—	normal	Not abnormal
9	Degree of Color	degree	2	less than 5
10	Turbidity	degree	Below 1	less than 2
11	Lead and its compound	mg/l	Below 0.001	less than 0.01
12	Zinc and its compound	mg/l	Below 0.1	less than 1.0
13	Iron and its compound	mg/l	0.04	less than 0.3
14	Copper and its compound	mg/l	Below 0.1	less than 1.0
15	Distillation residue	mg/l	120	less than 500
16	Chloroform	mg/l	0.011	less than 0.06
17	Bromo-dichloromethane	mg/l	0.0032	less than 0.03
18	Dibromo-chloromethane	mg/l	Below 0.001	less than 0.1
19	Bromoform	mg/l	Below 0.0009	less than 0.09
20	Tri-halomethane	mg/l	0.016	less than 0.1
21	Cyanide ion and cyanchloride	mg/l	Below 0.001	less than 0.01
22	Bromic acid	mg/l	Below 0.001	less than 0.01
23	Chloro-acetic acid	mg/l	Below 0.002	less than 0.02
24	Dichloro-acetic acid	mg/l	Below 0.004	less than 0.04
25	Tri-chloro-acetic acid	mg/l	Below 0.02	less than 0.2
26	Formaldehyde	mg/l	Below 0.008	less than 0.08
27	Chloric acid	mg/l	Below 0.06	less than 0.6

Methods of analysis are based on The Ministry of Health and Welfare Order No.101(30.May.2003)

The result of above-mentioned items of tap water suits the criteria of the Waterworks Law

Appendix 8-1 Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test (0 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
001																															
002																															
003																															
004																															
005																															
006																															
007																															
008																															
009																															
010																															
011																															
012																															
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Animal number	Days of administration																														
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43																	
001														TK																	
002														TK																	
003														TK																	
004														TK																	
005														TK																	
006														TK																	
007														TK																	
008														TK																	
009														TK																	
010														TK																	
011														TK																	
012														TK																	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																	

TK : Terminal killing.

A : Cumulative number of dead animals.

B : Mortality rate (%).

Appendix 8-2 Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test (100 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
013																														
014																														
015																														
016																														
017																														
018																														
019 UC																														
020																														
021																														
022																														
023																														
024																														
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration													
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
013														TK
014														TK
015														TK
016														TK
017														TK
018														TK
019 UC														TK
020														TK
021														TK
022														TK
023														TK
024														TK
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TK : Terminal killing. UC : Unsuccessful copulation.  
A : Cumulative number of dead animals. B : Mortality rate (%).

Appendix 8-3 Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test (300 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
025																														
026																														
027																														
028																														
029																														
030																														
031 FP																														
032																														
033																														
034																														
035																														
036																														
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration													
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
025														TK
026														TK
027														TK
028														TK
029														TK
030														TK
031 FP														TK
032														TK
033														TK
034														TK
035														TK
036														TK
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TK : Terminal killing. FP : Failed to cause pregnancy.  
A : Cumulative number of dead animals. B : Mortality rate (%).

Appendix 8-4 Individual fate and mortality rate in time course of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test (1000 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
037																														
038																														
039																														
040																														
041																														
042																														
043																														
044																														
045																														
046																														
047																														
048																														
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration													
	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
037														TK
038														TK
039														TK
040														TK
041														TK
042														TK
043														TK
044														TK
045														TK
046														TK
047														TK
048														TK
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TK : Terminal killing.

A : Cumulative number of dead animals.

B : Mortality rate (%).

Appendix 9-1 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test (0 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
501																												
502																												
503																												
504																												
505																												
506																												
507																												
508																												
509																												
510																												
511																												
512																												
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration																		
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
501																TK			
502																		TK	
503																			TK
504																		TK	
505																TK			
506																	TK		
507															TK				
508																	TK		
509															TK				
510																		TK	
511																	TK		
512																	TK		
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TK : Terminal killing on day 5 after perturbation.  
A : Cumulative number of dead animals.

B : Mortality rate (%).

Appendix 9-2 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test (100 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
513																												
514																												
515																												
516																												
517																												
518																												
519 UC																												
520																												
521																												
522																												
523																												
524																												
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration																								
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
513																									
514																									
515																									
516																									
517																									
518																									
519 UC																									
520																									
521																									
522																									
523																									
524																									
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TK : Terminal killing. UC : Unsuccessful copulation.

A : Cumulative number of dead animals.

B : Mortality rate (%).

Appendix 9-3 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test (300 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
525																												
526																												
527																												
528																												
529																												
530																												
531 NP																												
532																												
533																												
534																												
535																												
536																												
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration																											
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
525																TK												
526															TK													
527															TK													
528																			TK									
529																												TK
530																	TK											
531 NP															TK													
532															TK													
533																	TK											
534																	TK											
535																	TK											
536																		TK										
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TK : Terminal killing. NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.  
A : Cumulative number of dead animals. B : Mortality rate (%).

Appendix 9-4 Individual fate and mortality rate in time course of female rats treated orally with  
 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
 in the reproduction/developmental toxicity screening test  
 (1000 mg/kg/day)

Animal number	Days of administration																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
537																													
538																													
539																													
540																													
541																													
542																													
543																													
544																													
545																													
546																													
547																													
548																													
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animal number	Days of administration																		
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
537																	TK		
538																		TK	
539																		TK	
540																		TK	
541																	TK		
542																TK			
543															TK				
544																		TK	
545																TK			
546																		TK	
547																			TK
548																		TK	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TK : Terminal killing on day 5 after perturbation.  
 A : Cumulative number of dead animals.

B : Mortality rate (%).

Appendix 10-1 Individual general conditions of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Fate	Day of death <sup>a</sup>	General conditions (clinical signs)
0	001	TK	43	NAD
	002	TK	43	NAD
	003	TK	43	NAD
	004	TK	43	NAD
	005	TK	43	NAD
	006	TK	43	NAD
	007	TK	43	NAD
	008	TK	43	NAD
	009	TK	43	NAD
	010	TK	43	NAD
	011	TK	43	NAD
	012	TK	43	NAD
100	013	TK	43	NAD
	014	TK	43	NAD
	015	TK	43	NAD
	016	TK	43	NAD
	017	TK	43	NAD
	018	TK	43	NAD
	019 UC	TK	43	NAD
	020	TK	43	NAD
	021	TK	43	NAD
	022	TK	43	NAD
	023	TK	43	NAD
	024	TK	43	NAD

TK : Terminal killing. UC : Unsuccessful copulation.

a : Day after initiation of administration.

NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 10-2 Individual general conditions of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Fate	Day of death <sup>a</sup>	General conditions (clinical signs)
300	025	TK	43	NAD
	026	TK	43	NAD
	027	TK	43	NAD
	028	TK	43	NAD
	029	TK	43	NAD
	030	TK	43	NAD
	031	FP TK	43	NAD
	032	TK	43	NAD
	033	TK	43	NAD
	034	TK	43	NAD
	035	TK	43	NAD
	036	TK	43	NAD
	1000	037	TK	43
038		TK	43	NAD
039		TK	43	NAD
040		TK	43	NAD
041		TK	43	NAD
042		TK	43	NAD
043		TK	43	NAD
044		TK	43	NAD
045		TK	43	NAD
046		TK	43	NAD
047		TK	43	NAD
048		TK	43	NAD

TK : Terminal killing. FP : Failed to cause pregnancy.  
a : Day after initiation of administration.  
NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 11-1 Individual general conditions of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Fate	Day of death <sup>a</sup>	General conditions (clinical signs)
0	501	TK	44	NAD
	502	TK	46	NAD
	503	TK	47	NAD
	504	TK	46	NAD
	505	TK	44	NAD
	506	TK	45	NAD
	507	TK	43	NAD
	508	TK	45	NAD
	509	TK	43	NAD
	510	TK	46	NAD
	511	TK	45	NAD
	512	TK	45	NAD
100	513	TK	47	NAD
	514	TK	44	NAD
	515	TK	44	NAD
	516	TK	44	NAD
	517	TK	45	NAD
	518	TK	47	NAD
	519	UC TK	53	NAD
	520	TK	45	NAD
	521	TK	45	NAD
	522	TK	45	NAD
	523	TK	43	NAD
	524	TK	45	NAD

TK : Terminal kill on day 5 after parturition. UC : Unsuccessful copulation.

a : Day after initiation of administration.

NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 11-2 Individual general conditions of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Fate	Day of death <sup>a</sup>	General conditions (clinical signs)
300	525	TK	44	NAD
	526	TK	43	NAD
	527	TK	44	NAD
	528	TK	47	NAD
	529	TK	56	NAD
	530	TK	45	NAD
	531 NP	TK	43	NAD
	532	TK	44	NAD
	533	TK	45	NAD
	534	TK	45	NAD
	535	TK	45	NAD
	536	TK	46	NAD
	1000	537	TK	45
538		TK	46	NAD
539		TK	46	NAD
540		TK	46	NAD
541		TK	45	NAD
542		TK	44	NAD
543		TK	43	NAD
544		TK	46	NAD
545		TK	44	NAD
546		TK	46	NAD
547		TK	47	NAD
548		TK	46	NAD

TK : Terminal kill on day 5 after parturition.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

a : Day after initiation of administration.

NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 12-1 Individual body weights of male rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Administration period							Gain 1~42
			1	7	14	21	28	35	42	
0	001		359	387	387	423	450	473	487	128
	002		361	389	413	444	472	498	520	159
	003		369	392	416	432	442	459	463	94
	004		375	409	440	472	504	529	553	178
	005		377	404	441	466	484	504	517	140
	006		381	410	444	469	490	520	532	151
	007		387	418	452	488	513	532	567	180
	008		390	422	451	477	507	532	543	153
	009		396	430	457	473	504	525	545	149
	010		394	425	459	487	513	520	539	145
	011		393	427	448	472	495	518	527	134
	012		413	432	464	481	507	524	531	118
		Mean		383	412	439	465	490	511	527
100	013		367	398	416	426	454	475	473	106
	014		365	385	408	425	443	454	454	89
	015		372	390	413	430	466	478	476	104
	016		368	391	415	439	464	481	494	126
	017		368	407	428	453	477	486	500	132
	018		378	401	429	452	480	499	518	140
	019	UC	388	417	446	447	449	452	465	77
	020		397	408	437	461	481	493	476	79
	021		388	415	438	453	480	491	508	120
	022		398	431	457	477	507	524	542	144
	023		405	440	481	493	535	552	559	154
	024		409	445	482	502	531	548	569	160
		Mean		384	411	438	455	481	494	503

UC : Unsuccessful copulation.

Appendix 12-2 Individual body weights of male rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Administration period							Gain 1~42
			1	7	14	21	28	35	42	
300	025		364	390	411	431	446	461	456	92
	026		373	394	422	447	460	487	500	127
	027		371	392	416	440	468	480	508	137
	028		364	390	417	433	452	465	483	119
	029		380	408	439	469	493	507	520	140
	030		384	414	442	464	491	507	531	147
	031	FP	384	390	413	442	472	494	506	122
	032		397	420	447	475	501	515	518	121
	033		391	419	450	487	488	507	521	130
	034		397	422	450	475	508	520	537	140
	035		396	412	448	478	507	529	554	158
	036		411	436	481	516	541	573	582	171
		Mean		384	407	436	463	486	504	518
1000	037		366	393	419	449	476	498	495	129
	038		368	389	414	431	455	458	477	109
	039		372	404	427	463	482	509	523	151
	040		377	403	432	448	480	501	518	141
	041		377	401	419	438	461	481	492	115
	042		388	412	447	480	512	534	554	166
	043		381	410	442	464	489	511	533	152
	044		393	420	454	485	515	533	548	155
	045		384	411	426	463	484	510	516	132
	046		393	426	456	484	511	528	542	149
	047		403	442	474	494	518	539	552	149
	048		402	431	460	480	504	526	537	135
	Mean		384	412	439	465	491	511	524	140

FP : Failed to cause pregnancy.

Individual body weights of female rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Premating period				Pregnancy period					Lactation period		
			1	7	14	Gain 1~14	0	7	14	20	Gain 0~20	0	4	Gain 0~4
0	501		231	244	256	25	253	294	333	430	177	311	338	27
	502		231	230	250	19	267	306	345	408	141	333	345	12
	503		238	247	260	22	273	316	354	436	163	314	347	33
	504		239	243	265	26	286	315	360	441	155	333	363	30
	505		232	253	268	36	275	312	338	409	134	321	334	13
	506		236	244	251	15	263	300	337	423	160	285	330	45
	507		248	255	267	19	269	305	344	429	160	326	355	29
	508		245	256	265	20	276	307	347	444	168	298	339	41
	509		255	274	287	32	288	326	358	449	161	341	379	38
	510		247	255	268	21	269	311	349	392	123	357	355	-2
	511		246	253	256	10	271	309	345	436	165	331	358	27
	512		242	266	287	45	290	345	399	503	213	335	386	51
	Mean		241	252	265	24	273	312	351	433	160	324	352	29
100	513		228	227	254	26	277	319	361	446	169	320	372	52
	514		217	232	242	25	249	289	321	402	153	303	327	24
	515		225	249	258	33	264	307	356	444	180	339	358	19
	516		238	246	252	14	263	317	345	427	164	328	361	33
	517		238	240	241	3	258	296	341	423	165	306	321	15
	518		243	249	266	23	282	306	343	421	139	304	347	43
	519	UC	243	237	259	16	—	—	—	—	—	—	—	—
	520		254	266	274	20	279	310	345	421	142	332	352	20
	521		251	261	262	11	273	310	337	421	148	320	360	40
	522		238	254	254	16	267	294	326	410	143	293	321	28
	523		254	261	273	19	269	303	343	441	172	305	337	32
	524		248	265	273	25	285	324	355	439	154	308	349	41
		Mean		240	249	259	19	270	307	343	427	157	314	346

UC : Unsuccessful copulation.

Individual body weights of female rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Premating period				Pregnancy period					Lactation period		
			1	7	14	Gain 1~14	0	7	14	20	Gain 0~20	0	4	Gain 0~4
300	525		221	238	241	20	254	286	324	397	143	288	322	34
	526		236	252	252	16	259	298	335	429	170	325	336	11
	527		227	249	263	36	256	299	334	416	160	306	325	19
	528		247	260	267	20	285	332	368	448	163	355	371	16
	529		241	241	254	13	307	341	363	443	136	358	368	10
	530		235	251	249	14	264	305	336	409	145	321	320	-1
	531	NP	244	244	256	12	(247)	(282)	(303)	(299)	(52)	—	—	—
	532		253	254	269	16	279	312	360	433	154	319	345	26
	533		242	257	268	26	277	309	347	437	160	291	327	36
	534		251	257	276	25	283	323	358	435	152	333	360	27
	535		252	264	281	29	284	319	364	438	154	346	376	30
	536		254	258	276	22	288	315	351	446	158	317	371	54
		Mean		242	252	263	21	276	313	349	430	154	324	347
1000	537		228	234	241	13	250	295	335	418	168	347	337	-10
	538		231	231	245	14	252	292	334	423	171	315	357	42
	539		228	231	236	8	244	275	311	398	154	288	324	36
	540		232	236	243	11	260	292	326	367	107	313	340	27
	541		237	251	264	27	273	301	339	414	141	319	345	26
	542		239	253	260	21	252	289	317	386	134	291	321	30
	543		249	260	271	22	274	313	361	458	184	349	370	21
	544		238	258	258	20	278	316	352	445	167	325	358	33
	545		242	258	262	20	260	312	338	421	161	306	341	35
	546		251	265	264	13	271	314	360	453	182	329	355	26
	547		253	274	284	31	304	335	369	438	134	350	376	26
	548		245	261	275	30	295	324	370	456	161	368	376	8
	Mean		239	251	259	19	268	305	343	423	155	325	350	25

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation. ( ) : Not included in statistics.

## Appendix 13-3

Individual body weights of female rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Administration period								
			1	7	14	21	28	35	42	49	52
100	519 UC		243	237	259	292	325	321	328	330	312

UC : Unsuccessful copulation.

Appendix 14-1 Individual food consumption of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test (g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Administration period						
			1	7	14	21	28	35	41
0	001		24	24	26	29	28	30	27
	002		31	35	34	32	37	35	34
	003		30	27	29	27	24	27	28
	004		33	32	36	35	33	38	35
	005		33	33	31	31	30	31	28
	006		30	35	28	31	30	31	31
	007		32	34	38	32	32	30	33
	008		28	32	36	36	35	35	35
	009		35	32	34	33	31	36	32
	010		35	34	29	30	28	30	29
	011		37	31	35	31	34	32	28
	012		33	36	33	31	34	30	32
	Mean		32	32	32	32	31	32	31
100	013		31	31	27	29	30	29	27
	014		29	29	28	30	28	31	27
	015		33	32	31	31	35	35	31
	016		29	32	31	29	32	30	29
	017		35	30	30	28	30	30	30
	018		28	34	32	33	29	34	33
	019	UC	31	30	27	—	—	27	28
	020		32	33	33	28	32	29	24
	021		33	31	29	29	26	29	30
	022		36	37	30	24	29	35	28
	023		36	36	35	33	31	34	30
	024		39	36	34	34	32	33	34
	Mean		33	33	31	30	30	31	29

— : Could not measured for mating. UC : Unsuccessful copulation.

Appendix 14-2 Individual food consumption of male rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test  
( g/rat/day )

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Administration period						
			1	7	14	21	28	35	41
300	025		32	30	30	32	26	29	22
	026		26	30	30	27	29	29	29
	027		27	26	30	31	31	32	32
	028		26	30	29	28	27	28	29
	029		34	36	36	—	—	31	32
	030		38	32	30	33	26	31	34
	031	FP	37	30	32	31	31	33	32
	032		39	37	34	37	32	33	30
	033		33	33	33	28	29	32	32
	034		34	34	36	35	30	34	31
	035		25	34	32	32	33	35	33
	036		37	35	35	33	33	37	34
	Mean		32	32	32	32	30	32	31
1000	037		31	27	27	30	32	29	28
	038		34	28	31	33	27	29	29
	039		29	31	31	33	29	31	30
	040		26	33	27	36	32	33	32
	041		33	32	33	30	33	31	27
	042		35	35	35	36	31	35	34
	043		33	34	32	38	30	35	33
	044		31	32	36	33	36	35	33
	045		32	30	32	28	31	29	28
	046		35	38	37	35	33	36	31
	047		30	37	34	33	31	35	27
048		36	36	38	40	35	37	34	
	Mean		32	33	33	34	32	33	31

— : Could not measured for mating. FP : Failed to cause pregnancy.

## Appendix 15-1

Individual food consumption of female rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Premating period			Pregnancy period				Lactation period	
			1	7	14	0	7	14	20	0	3
0	501		22	17	23	10	24	27	27	23	50
	502		24	22	18	18	24	27	29	24	42
	503		22	22	14	21	26	29	23	34	61
	504		24	22	17	19	29	30	31	24	49
	505		24	26	23	12	27	26	27	23	38
	506		13	24	22	19	25	24	20	23	57
	507		24	18	24	16	25	23	27	18	51
	508		20	25	23	17	29	26	24	21	51
	509		25	19	27	33	28	28	27	28	50
	510		17	22	20	20	31	25	28	22	30
	511		19	25	24	18	27	31	32	32	51
	512		23	29	27	24	34	33	25	28	56
	Mean		21	23	22	19	27	27	27	25	49
100	513		20	21	19	20	24	30	31	26	59
	514		22	21	22	14	25	25	27	21	46
	515		22	22	23	19	29	31	33	26	52
	516		24	18	25	17	28	29	29	35	49
	517		16	23	21	22	26	24	24	2	49
	518		22	23	16	16	26	27	22	25	54
	519	UC	25	22	17	—	—	—	—	—	—
	520		26	18	25	15	27	28	30	30	45
	521		16	22	26	16	25	27	32	29	58
	522		21	22	21	16	27	23	22	17	41
	523		25	18	21	21	26	26	25	24	54
	524		24	23	23	14	23	28	27	22	45
		Mean		22	21	22	17	26	27	27	23

UC : Unsuccessful copulation.

## Appendix 15-2

Individual food consumption of female rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Premating period			Pregnancy period				Lactation period		
			1	7	14	0	7	14	20	0	3	
300	525		20	20	21	19	24	26	25	27	52	
	526		22	19	21	18	27	25	29	13	59	
	527		24	24	24	15	26	28	31	18	36	
	528		22	24	13	17	27	30	32	23	54	
	529		24	22	15	18	24	28	33	26	51	
	530		18	24	26	21	25	25	32	5	44	
	531	NP	21	23	15	(8)	(24)	(20)	(19)	—	—	
	532		24	22	24	18	28	26	26	27	48	
	533		25	24	22	17	24	25	25	20	48	
	534		18	23	24	16	28	29	34	28	53	
	535		23	23	23	8	29	30	31	31	50	
	536		23	24	21	18	24	23	26	22	57	
	Mean			22	23	21	17	26	27	29	22	50
	1000	537		17	23	21	21	32	30	31	17	42
538			22	21	19	17	26	27	27	29	57	
539			23	20	16	16	22	25	25	29	47	
540			17	22	23	15	25	23	25	32	49	
541			24	23	21	18	25	26	26	32	48	
542			23	16	23	19	20	24	25	28	46	
543			25	19	25	20	28	31	29	32	49	
544			19	24	25	20	28	27	29	29	52	
545			22	21	23	16	28	30	32	25	53	
546			19	26	24	23	28	27	26	29	54	
547			24	25	20	19	24	25	28	35	55	
548			20	24	24	22	33	27	34	32	47	
Mean				21	22	22	19	27	27	28	29	50

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation. ( ) : Not included in statistics.

Appendix 15-3 Individual food consumption of female rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day	Administration period								
			1	7	14	21	28	35	42	49	51
100	519 UC		25	22	17	—	—	15	23	20	21

UC : Unsuccessful copulation. — : Could not measured for mating.

Appendix 16-1 Individual pathological findings of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal Fate number	Necropsy		Histology
0	001	NAD	a	NAD
	002	NAD	a	NAD
	003	NAD	a	Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +
	004	NAD	a	Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +
	005	NAD	a	NAD
	006	NAD	a	NAD
	007	NAD	a	NAD
	008	NAD	a	NAD
	009	NAD	a	NAD
	010	NAD	a	Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +
	011	NAD	a	NAD
	012	NAD	a	NAD

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

a : Organs of the cecum, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

Appendix 16-2 Individual pathological findings of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy	Histology
100	013	NAD	Not examined
	014	NAD	Not examined
	015	NAD	Not examined
	016	NAD	Not examined
	017	NAD	Not examined
	018	NAD	Not examined
	019 UC	NAD	Pituitary : NAD Testis : NAD Prostate : NAD Epididymis : NAD Seminal vesicle : NAD
	020	NAD	Not examined
	021	NAD	Not examined
	022	NAD	Not examined
	023	NAD	Not examined
	024	NAD	Not examined

UC : Unsuccessful copulation.  
NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 16-3 Individual pathological findings of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy	Histology	
300	025	NAD	Not examined	
	026	NAD	Not examined	
	027	NAD	Not examined	
	028	NAD	Not examined	
	029	NAD	Not examined	
	030	NAD	Not examined	
	031	FP	NAD	Pituitary : NAD Testis : NAD Prostate : NAD Epididymis : NAD Seminal vesicle : NAD
	032		NAD	Not examined
	033		NAD	Not examined
	034		NAD	Not examined
	035		NAD	Not examined
	036		NAD	Not examined

FP : Failed to cause pregnancy.  
 NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 16-4 Individual pathological findings of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy		Histology
1000	037	Epididymis : Nodule ( $\Phi$ 8 mm), left side, ++	a	Epididymis : Granuloma, spermatic + Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium ++
	038	NAD	a	Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium ++
	039	NAD	a	NAD
	040	Cecum : Distention +	a	Cecum : NAD Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +
	041	NAD	a	: NAD
	042	Cecum : Distention +	a	Cecum : NAD
	043	NAD	a	: NAD
	044	Cecum : Distention +	a	Cecum : NAD
	045	Cecum : Distention +	a	Cecum : NAD
	046	Cecum : Distention +	a	Cecum : NAD Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +
	047	Cecum : Distention +	a	Cecum : NAD
	048	Cecum : Distention +	a	Cecum : NAD Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium +

NAD : No abnormalities were detected.

+ : Slight.

++ : Moderate.

a : Organs of the cecum, testis, prostate, epididymis and seminal vesicle were examined.

## Appendix 16-5

The number of cells in seminiferous epithelia assessed by the individual examination  
4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal No.	Stage II-III			Stage V			Stage VII			Stage X II	
		G	P	T	G	P	T	G	R/P	T	G	Z/P
0	001	0.35	1.81	6.38	0.70	2.05	6.29	0.05	3.34	6.74	0.05	4.25
	002	0.44	2.06	6.34	0.60	1.64	5.70	0.07	2.85	5.60	0.05	4.24
	003	0.39	1.74	6.40	0.67	1.88	6.13	0.07	2.96	6.55	0.07	4.39
	004	0.37	1.85	5.73	0.70	1.88	5.97	0.05	3.04	5.88	0.07	4.09
	005	0.46	1.96	5.81	0.64	2.12	6.26	0.06	3.12	6.41	0.06	4.08
	006	0.39	1.99	6.58	0.60	1.75	6.05	0.06	2.79	5.51	0.05	4.41
	007	0.44	1.79	6.18	0.59	1.77	5.67	0.05	3.20	6.50	0.05	4.16
	008	0.47	1.87	6.15	0.56	1.65	6.10	0.05	3.23	6.36	0.05	4.20
	009	0.43	1.85	6.29	0.59	1.88	5.85	0.06	3.08	5.95	0.06	4.48
	010	0.45	1.80	6.11	0.54	1.89	5.84	0.05	2.99	6.39	0.05	4.13
	011	0.45	1.87	6.20	0.61	1.71	5.80	0.06	2.70	6.10	0.07	4.04
	012	0.49	1.82	5.53	0.58	1.88	6.03	0.06	3.10	6.00	0.06	4.43
	Mean	0.43	1.87	6.14	0.62	1.84	5.97	0.06	3.03	6.17	0.06	4.24
1000	037	0.50	1.86	6.01	0.60	1.77	5.85	0.06	3.11	5.99	0.05	4.57
	038	0.41	1.75	5.94	0.56	1.62	5.84	0.06	3.32	6.81	0.06	4.14
	039	0.42	1.96	5.89	0.62	1.77	6.19	0.05	3.17	6.01	0.06	4.63
	040	0.38	1.95	6.15	0.60	1.89	6.09	0.05	2.87	6.03	0.06	4.20
	041	0.37	1.83	5.74	0.53	1.86	6.05	0.05	3.17	6.12	0.06	4.06
	042	0.50	1.85	6.35	0.61	1.79	6.00	0.07	2.92	6.13	0.05	4.11
	043	0.44	1.73	5.84	0.55	1.81	6.54	0.05	2.90	6.19	0.07	3.92
	044	0.33	1.65	5.81	0.61	1.90	6.16	0.07	2.98	6.38	0.05	4.45
	045	0.36	1.69	5.76	0.56	1.86	6.19	0.06	3.02	6.59	0.06	4.55
	046	0.41	1.81	5.89	0.59	1.75	5.97	0.06	3.00	6.35	0.06	4.60
	047	0.40	1.83	5.83	0.65	1.82	6.23	0.06	3.09	6.39	0.05	4.32
	048	0.47	1.81	5.51	0.69	1.99	6.21	0.05	3.10	5.74	0.05	4.00
	Mean	0.42	1.81	5.89	0.60	1.82	6.11	0.06	3.05	6.23	0.06	4.30

G : spermatogonia.

P : pachytene spermatocyte.

R : preleptotene spermatocyte.

Z : zygotene spermatocyte.

T : round spermatid.

Each value represents the mean for data from 3 seminiferous epithelia.

Appendix 17-1 Individual pathological findings of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal Fate number	Necropsy		Histology
0	501	NAD	b	NAD
	502	NAD	b	NAD
	503	NAD	b	NAD
	504	NAD	b	NAD
	505	NAD	b	NAD
	506	NAD	b	NAD
	507	NAD	b	NAD
	508	NAD	b	NAD
	509	NAD	b	NAD
	510	NAD	b	NAD
	511	NAD	b	NAD
	512	NAD	b	NAD

NAD : No abnormalities were detected.

b : Organs of the cecum, ovary and uterus were examined.

Appendix 17-2 Individual pathological findings of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal Fate number	Necropsy	Histology
100	513	NAD	Not examined
	514	NAD	Not examined
	515	NAD	Not examined
	516	NAD	Not examined
	517	NAD	Not examined
	518	NAD	Not examined
	519 UC	NAD	Pituitary : NAD Ovary : NAD Uterus : NAD
	520	NAD	Not examined
	521	NAD	Not examined
	522	NAD	Not examined
	523	NAD	Not examined
	524	NAD	Not examined

UC : Unsuccessful copulation.  
NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 17-3 Individual pathological findings of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy	Histology	
300	525	NAD	Not examined	
	526	NAD	Not examined	
	527	NAD	Not examined	
	528	NAD	Not examined	
	529	NAD	Not examined	
	530	NAD	Not examined	
	531	NP	NAD	Pituitary : NAD Ovary : NAD Uterus : NAD
	532		NAD	Not examined
	533		NAD	Not examined
	534		NAD	Not examined
	535		NAD	Not examined
	536		NAD	Not examined

NP : Non pregnant.  
NAD : No abnormalities were detected.

Appendix 17-4 Individual pathological findings of female rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Necropsy		Histology
1000	537	Cecum : Distention +	b	NAD
	538	NAD	b	NAD
	539	NAD	b	NAD
	540	NAD	b	NAD
	541	NAD	b	NAD
	542	NAD	b	NAD
	543	Cecum : Distention +	b	NAD
	544	Cecum : Distention +	b	NAD
	545	Cecum : Distention +	b	NAD
	546	Cecum : Distention +	b	NAD
	547	Cecum : Distention +	b	NAD
	548	Cecum : Distention +	b	NAD

NAD : No abnormalities were detected.  
 + : Slight.  
 NP : Non pregnant.  
 b : Organs of the cecum, ovary and uterus were examined.

## Appendix 18-1

Individual absolute organ weights of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Prostate (g)	Seminal vesicle (g)	Testis (g)	Epididymis (g)
0	001		455	0.74	1.67	3.59	1.42
	002		474	0.78	2.49	3.38	1.33
	003		437	0.75	2.58	3.72	1.50
	004		519	0.47	2.16	3.01	1.27
	005		476	0.73	2.13	3.35	1.25
	006		493	0.61	2.51	3.21	1.39
	007		509	0.75	1.61	3.26	1.38
	008		511	0.59	2.37	3.59	1.36
	009		500	0.89	2.60	3.70	1.39
	010		506	0.66	2.46	3.56	1.36
	011		493	0.82	2.67	3.62	1.40
	012		501	0.83	2.66	3.46	1.34
		Mean		490	0.72	2.33	3.45
100	013		445	0.66	2.24	3.39	1.16
	014		429	0.72	2.52	3.17	1.25
	015		452	0.85	2.51	3.41	1.38
	016		468	0.54	2.40	3.08	1.28
	017		466	0.77	2.00	3.36	1.58
	018		482	0.90	1.95	2.81	1.08
	019	UC	437	0.91	1.97	3.48	1.33
	020		453	0.55	3.01	3.59	1.44
	021		468	0.70	2.12	3.80	1.34
	022		501	0.56	2.14	3.63	1.42
	023		524	0.79	2.15	3.17	1.52
	024		527	0.71	2.21	3.59	1.48
		Mean		471	0.72	2.27	3.37

UC : Unsuccessful copulation.

## Appendix 18-2

Individual absolute organ weights of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Prostate (g)	Seminal vesicle (g)	Testis (g)	Epididymis (g)
300	025		434	0.65	3.31	2.82	1.34
	026		467	0.59	2.43	3.44	1.30
	027		465	0.70	2.22	3.48	1.61
	028		453	0.64	2.75	3.15	1.32
	029		491	0.62	2.08	3.55	1.39
	030		486	0.81	2.17	3.21	1.26
	031	FP	466	0.59	2.85	3.45	1.61
	032		480	0.60	2.77	3.57	1.53
	033		492	0.72	2.86	3.67	1.49
	034		505	0.56	2.74	3.61	1.42
	035		513	1.00	3.04	3.49	1.70
	036		535	0.61	2.32	3.47	1.48
		Mean		482	0.67	2.63	3.41
1000	037		475	0.27	2.58	3.39	1.77
	038		442	0.41	2.04	3.30	1.37
	039		492	0.96	2.70	3.62	1.31
	040		488	0.78	2.53	3.58	1.59
	041		462	0.61	2.74	3.24	1.44
	042		520	0.78	2.10	3.25	1.31
	043		495	0.65	2.13	3.54	1.30
	044		504	0.63	2.32	3.25	1.55
	045		486	0.74	2.38	3.48	1.50
	046		511	0.66	2.12	3.83	1.23
	047		520	0.89	2.94	3.63	1.75
	048		502	0.73	2.66	3.72	1.51
		Mean		491	0.68	2.44	3.49

FP : Failed to cause pregnancy.

## Appendix 19-1

Individual relative organ weights of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Prostate (%)	Seminal vesicle (%)	Testis (%)	Epididymis (%)
0	001		455	0.16	0.37	0.79	0.31
	002		474	0.16	0.53	0.71	0.28
	003		437	0.17	0.59	0.85	0.34
	004		519	0.09	0.42	0.58	0.24
	005		476	0.15	0.45	0.70	0.26
	006		493	0.12	0.51	0.65	0.28
	007		509	0.15	0.32	0.64	0.27
	008		511	0.12	0.46	0.70	0.27
	009		500	0.18	0.52	0.74	0.28
	010		506	0.13	0.49	0.70	0.27
	011		493	0.17	0.54	0.73	0.28
	012		501	0.17	0.53	0.69	0.27
		Mean		490	0.15	0.48	0.71
100	013		445	0.15	0.50	0.76	0.26
	014		429	0.17	0.59	0.74	0.29
	015		452	0.19	0.56	0.75	0.31
	016		468	0.12	0.51	0.66	0.27
	017		466	0.17	0.43	0.72	0.34
	018		482	0.19	0.40	0.58	0.22
	019	UC	437	0.21	0.45	0.80	0.30
	020		453	0.12	0.66	0.79	0.32
	021		468	0.15	0.45	0.81	0.29
	022		501	0.11	0.43	0.72	0.28
	023		524	0.15	0.41	0.60	0.29
	024		527	0.13	0.42	0.68	0.28
		Mean		471	0.16	0.48	0.72

UC : Unsuccessful copulation.

## Appendix 19-2

Individual relative organ weights of male rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal numbers	Fate	B.W. (g)	Prostate (%)	Seminal vesicle (%)	Testis (%)	Epididymis (%)
300	025		434	0.15	0.76	0.65	0.31
	026		467	0.13	0.52	0.74	0.28
	027		465	0.15	0.48	0.75	0.35
	028		453	0.14	0.61	0.70	0.29
	029		491	0.13	0.42	0.72	0.28
	030		486	0.17	0.45	0.66	0.26
	031	FP	466	0.13	0.61	0.74	0.35
	032		480	0.13	0.58	0.74	0.32
	033		492	0.15	0.58	0.75	0.30
	034		505	0.11	0.54	0.71	0.28
	035		513	0.19	0.59	0.68	0.33
	036		535	0.11	0.43	0.65	0.28
		Mean		482	0.14	0.55	0.71
1000	037		475	0.06	0.54	0.71	0.37
	038		442	0.09	0.46	0.75	0.31
	039		492	0.20	0.55	0.74	0.27
	040		488	0.16	0.52	0.73	0.33
	041		462	0.13	0.59	0.70	0.31
	042		520	0.15	0.40	0.63	0.25
	043		495	0.13	0.43	0.72	0.26
	044		504	0.13	0.46	0.64	0.31
	045		486	0.15	0.49	0.72	0.31
	046		511	0.13	0.41	0.75	0.24
	047		520	0.17	0.57	0.70	0.34
	048		502	0.15	0.53	0.74	0.30
	Mean		491	0.14	0.50	0.71	0.30

FP : Failed to cause pregnancy.

Individual estrous cycle of rats before mating period treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day of the inspection period															Mean estrous cycle# (day)	Group mean estrous cycle (day)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
0	501	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	4.1
	502	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	503	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	504	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	505	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	506	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	507	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	V	I	V	V	I	5.0	
	508	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	509	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	510	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	511	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	512	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	(0/12) <sup>a</sup>
100	513	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	4.1
	514	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	515	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	516	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	V	4.5	
	517	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	518	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	519	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	520	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	521	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	522	III	IV	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.3	
	523	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.5	
	524	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	(0/12) <sup>a</sup>

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metestrus. V: Diestrus. #: Mean days from III to next III.  
a : (No. of females with disorder of estrous cycle / No. of females).

## Appendix 20-2

Individual estrous cycle of rats before mating period treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	Animal number	Day of the inspection period															Mean estrous cycle# (day)	Group mean estrous cycle (day)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
300	525	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	4.2
	526	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	527	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	528	IV	V	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	V	I	III	5.0	
	529	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	530	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	531	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	532	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	I	III	IV	V	V	4.5	
	533	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	534	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	V	I	III	IV	V	V	5.0	
	535	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
536	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	(0/12) <sup>a</sup>	
1000	537	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	4.3
	538	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	539	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	4.0	
	540	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	541	III	IV	V	V	I	III	IV	V	V	V	I	III	IV	V	V	5.5	
	542	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	543	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	4.0	
	544	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	545	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	4.0	
	546	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	
	547	IV	V	I	III	III	IV	V	I	III	III	IV	V	V	I	III	5.5	
548	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	V	I	III	IV	4.0	(0/12) <sup>a</sup>	

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metestrus. V: Diestrus. # : Mean days from III to next III.

a : (No. of females with disorder of estrous cycle / No. of females).

Appendix 21-1

Individual estrous cycle of rats in mating period treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 0 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Day of the mating period																								
		1			2			3			4			5			6			7			8			
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	
501	001	-	I	-	+	III	+																			
502	002	-	IV	-	-	V	-							+	III	+										
503	003	-	IV	-	-	V	-				I	-		+	III	+										
504	004	-	IV	-	-	V	-				I	-		+	III	+										
505	005	-	I	-	+	III	+																			
506	006	-	V	-	-	I	-				+	III	+													
507	007	+	III	+																						
508	008	-	V	-	-	I	-				+	III	+													
509	009	+	III	+																						
510	010	-	V	-	-	I	-				+	III	+													
511	011	-	V	-	-	I	-				+	III	+													
512	012	-	I	-	+	III	+																			

-59-

Female number	Paired male number	Day of the mating period																					Pairing Day until copulation (Day)	Group mean pairing Day until copulation (Day)	
		9			10			11			12			13			14								
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm			
501	001																							2	
502	002																							4	
503	003																							4	
504	004																							4	
505	005																							2	
506	006																							3	
507	007																							1	2.7
508	008																							3	
509	009																							1	
510	010																							3	
511	011																							3	
512	012																							2	

Study No. 10-036

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metestrus. V: Diestrus.  
 + : Confirmed. - : Not confirmed.

Appendix 21-2

Individual estrous cycle of rats in mating period treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 100 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Day of the mating period																								
		1			2			3			4			5			6			7			8			
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	
513	013	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+													
514	014	-	I	-	+	III	+																			
515	015	-	I	-	+	III	+																			
516	016	-	V	-	+	III	+																			
517	017	-	V	-	-	I	-	+	III	+																
518	018	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+													
519	019	-	IV	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-
520	020	-	III	-	+	III	+																			
521	021	-	V	-	-	I	-	+	III	+																
522	022	-	V	-	-	I	-	+	III	+																
523	023	+	III	+																						
524	024	-	I	-	+	III	+																			

Female number	Paired male number	Day of the mating period																		Pairing Day until copulation (Day)	Group mean pairing Day until copulation (Day)				
		9			10			11			12			13			14								
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm						
513	013																					4			
514	014																					2			
515	015																					2			
516	016																					2			
517	017																					3			
518	018																					4			
519	019	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-		2.5
520	020																					2			
521	021																					3			
522	022																					3			
523	023																					1			
524	024																					2			

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metestrus. V: Diestrus.  
 + : Confirmed. - : Not confirmed.

-60- Study No. 10-036

## Appendix 21-3

Individual estrous cycle of rats in mating period treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 300 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Day of the mating period																									
		1			2			3			4			5			6			7			8				
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm		
525	025	-	I	-	+	III	+																				
526	026	+	III	+																							
527	027	-	I	-	+	III	+																				
528	028	-	IV	-	-	V	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+											
529	029	-	IV	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V
530	030	-	V	-	-	I	-	+	III	+																	
531	031	+	III	+																							
532	032	-	I	-	+	III	+																				
533	033	-	I	-	+	III	+																				
534	034	-	V	-	-	I	-	+	III	+																	
535	035	-	I	-	+	III	+																				
536	036	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+														

Female number	Paired male number	Day of the mating period																		Pairing Day until copulation (Day)	Group mean pairing Day until copulation (Day)		
		9			10			11			12			13			14						
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm				
525	025																					2	
526	026																					1	
527	027																					2	
528	028																					5	
529	029	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+			14	
530	030																					3	
531	031																						3.4
532	032																					1	
533	033																					2	
534	034																					3	
535	035																					2	
536	036																					4	

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metestrus. V: Diestrus.  
+ : Confirmed. - : Not confirmed.

Appendix 21-4

Individual estrous cycle of rats in mating period treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 1000 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Day of the mating period																								
		1			2			3			4			5			6			7			8			
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	
537	037	-	V	-	-	I	-	+	III	+																
538	038	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+													
539	039	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+													
540	040	-	V	-	-	I	-	+	III	+																
541	041	-	I	-	+	III	+																			
542	042	+	III	+																						
543	043	+	III	+																						
544	044	-	V	-	-	I	-	+	III	+																
545	045	-	I	-	+	III	+																			
546	046	-	V	-	-	I	-	+	III	+																
547	047	-	IV	-	-	V	-	-	I	-	+	III	+													
548	048	-	V	-	-	I	-	+	III	+																

Female number	Paired male number	Day of the mating period																		Pairing Day until copulation (Day)	Group mean pairing Day until copulation (Day)	
		9			10			11			12			13			14					
		Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm	Vaginal plug	Estrous cycle	Sperm			
537	037																				3	
538	038																				4	
539	039																				4	
540	040																				3	
541	041																				2	
542	042																				1	
543	043																				1	2.8
544	044																				3	
545	045																				2	
546	046																				3	
547	047																				4	
548	048																				3	

I : Proestrus. III: Vaginal estrus. IV: Metestrus. V: Diestrus.  
 + : Confirmed. - : Not confirmed.

-62- Study No. 10-036

Appendix 22-1 Individual reproduction results of rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 0 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
501	001	'10.10.9	2	+	+	'10.10.31	22	TK	19	18	94.7
502	002	'10.10.11	4	+	+	'10.11.2	22	TK	13	13	100.0
503	003	'10.10.11	4	+	+	'10.11.3	23	TK	17	17	100.0
504	004	'10.10.11	4	+	+	'10.11.2	22	TK	16	15	93.8
505	005	'10.10.9	2	+	+	'10.10.31	22	TK	15	13	86.7
506	006	'10.10.10	3	+	+	'10.11.1	22	TK	17	17	100.0
507	007	'10.10.8	1	+	+	'10.10.30	22	TK	14	14	100.0
508	008	'10.10.10	3	+	+	'10.11.1	22	TK	18	18	100.0
509	009	'10.10.8	1	+	+	'10.10.30	22	TK	16	16	100.0
510	010	'10.10.10	3	+	+	'10.11.2	23	TK	12	5	41.7
511	011	'10.10.10	3	+	+	'10.11.1	22	TK	17	17	100.0
512	012	'10.10.9	2	+	+	'10.11.1	23	TK	19	19	100.0
		Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	
			12			12					
		12/12	2.7	12/12	12/12	22.3	16.1	15.2	93.1		
		(100)	1.1	(100)	(100)	0.5	2.2	3.8	16.7		

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100.

Gestation index = (No. of females with live pups /No. of pregnant females)×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition.

a : Confirmed. b : Not confirmed.

Appendix 22-2 Individual reproduction results of rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 100 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
513	013	'10.10.11	4	+	+	'10.11.3	23	TK	19	17	89.5
514	014	'10.10.9	2	+	+	'10.10.31	22	TK	14	14	100.0
515	015	'10.10.9	2	+	+	'10.10.31	22	TK	17	17	100.0
516	016	'10.10.9	2	+	+	'10.10.31	22	TK	18	18	100.0
517	017	'10.10.10	3	+	+	'10.11.1	22	TK	17	17	100.0
518	018	'10.10.11	4	+	+	'10.11.3	23	TK	19	16	84.2
519	UC 019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
520	020	'10.10.9	2	+	+	'10.11.1	23	TK	16	15	93.8
521	021	'10.10.10	3	+	+	'10.11.1	22	TK	15	15	100.0
522	022	'10.10.10	3	+	+	'10.11.1	22	TK	17	17	100.0
523	023	'10.10.8	1	+	+	'10.10.30	22	TK	19	19	100.0
524	024	'10.10.9	2	+	+	'10.11.1	23	TK	16	15	93.8
		Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	
			11			11					
		11/12 (91.7)	2.5 0.9	11/11 (100)	11/11 (100)	22.4 0.5	17.0 1.7	16.4 1.5	96.5 5.5		

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100.

Gestation index = (No. of females with live pups /No. of pregnant females)×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition.

a : Confirmed. b : Not confirmed.

UC : Unsuccessful copulation.

Appendix 22-3 Individual reproduction results of rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 300 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
525	025	'10.10.9	2	+	+	'10.10.31	22	TK	16	15	93.8
526	026	'10.10.8	1	+	+	'10.10.30	22	TK	18	18	100.0
527	027	'10.10.9	2	+	+	'10.10.31	22	TK	17	15	88.2
528	028	'10.10.12	5	+	+	'10.11.3	22	TK	16	16	100.0
529	029	'10.10.21	14	+	+	'10.11.12	22	TK	15	13	86.7
530	030	'10.10.10	3	+	+	'10.11.1	22	TK	16	16	100.0
531	NP 031	'10.10.8	1	-	-	-	-	-	-	-	-
532	032	'10.10.9	2	+	+	'10.10.31	22	TK	15	15	100.0
533	033	'10.10.9	2	+	+	'10.11.1	23	TK	17	17	100.0
534	034	'10.10.10	3	+	+	'10.11.1	22	TK	17	17	100.0
535	035	'10.10.9	2	+	+	'10.11.1	23	TK	16	14	87.5
536	036	'10.10.11	4	+	+	'10.11.2	22	TK	16	16	100.0
		Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	
			12			11	11	11	11	11	
		12/12 (100)	3.4	11/12 (91.7)	11/12 (91.7)	22.2	16.3	15.6	96.0		
			3.5			0.4	0.9	1.4	5.8		

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100.

Gestation index = (No. of females with live pups /No. of pregnant females)×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition.

a : Confirmed. b : Not confirmed.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Appendix 22-4 Individual reproduction results of rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

( 1000 mg/kg/day )

Female number	Paired male number	Date of copulation	Pairing days until copulation (days)	Pregnancy (+:a, -:b)	Parturition (+:a, -:b)	Date of delivery	Gestation length (days)	Fate of pregnant	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index (%)
537	037	'10.10.10	3	+	+	'10.11.1	22	TK	14	14	100.0
538	038	'10.10.11	4	+	+	'10.11.2	22	TK	16	16	100.0
539	039	'10.10.11	4	+	+	'10.11.2	22	TK	14	14	100.0
540	040	'10.10.10	3	+	+	'10.11.2	23	TK	16	15	93.8
541	041	'10.10.9	2	+	+	'10.11.1	23	TK	16	16	100.0
542	042	'10.10.8	1	+	+	'10.10.31	23	TK	17	16	94.1
543	043	'10.10.8	1	+	+	'10.10.30	22	TK	14	14	100.0
544	044	'10.10.10	3	+	+	'10.11.2	23	TK	15	15	100.0
545	045	'10.10.9	2	+	+	'10.10.31	22	TK	17	15	88.2
546	046	'10.10.10	3	+	+	'10.11.2	23	TK	19	19	100.0
547	047	'10.10.11	4	+	+	'10.11.3	23	TK	15	14	93.3
548	048	'10.10.10	3	+	+	'10.11.2	23	TK	18	18	100.0
		Copulation index (%)	No. Mean S.D.	Fertility index (%)	Gestation index (%)	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	No. Mean S.D.	
			12			12	12	12	12	12	
		12/12	2.8	12/12	12/12	22.6	15.9	15.5	97.5		
		(100)	1.1	(100)	(100)	0.5	1.6	1.6	4.0		

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100.

Gestation index = (No. of females with live pups /No. of pregnant females)×100.

TK : Terminal kill on day 5 after parturition.

a : Confirmed. b : Not confirmed.

Appendix 23-1 Individual litter results of rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 0 mg/kg/day ]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation							Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
				Live pups				Dead pups				T	M	F		On day 0		On day 4	
				T	M	F	SI	M	F	M						F	M	F	
501	18	17	94.4	17	11	6	0	0	0	0	100.0	17	11	6	100.0	6.3	6.1	10.0	9.4
502	13	11	84.6	11	2	9	0	0	0	0	100.0	11	2	9	100.0	7.1	7.0	12.0	12.0
503	17	16	94.1	16	8	8	0	0	0	0	100.0	16	8	8	100.0	7.2	6.9	11.3	10.8
504	15	15	100.0	15	8	7	0	0	0	0	100.0	15	8	7	100.0	6.7	6.8	10.9	10.8
505	13	12	92.3	12	4	8	0	0	0	0	100.0	12	4	8	100.0	7.2	7.0	12.0	11.3
506	17	17	100.0	17	10	7	0	0	0	0	100.0	17	10	7	100.0	6.2	6.1	9.9	10.1
507	14	14	100.0	14	4	10	0	0	0	0	100.0	14	4	10	100.0	6.6	6.2	10.9	9.9
508	18	18	100.0	18	8	10	0	0	0	0	100.0	18	8	10	100.0	6.4	6.4	10.1	9.4
509	16	16	100.0	16	7	9	0	0	0	0	100.0	15	6	9	93.8	5.9	6.0	9.6	9.6
510	5	5	100.0	5	3	2	0	0	0	0	100.0	5	3	2	100.0	8.7	8.2	16.7	16.0
511	17	17	100.0	17	8	9	0	0	0	0	100.0	17	8	9	100.0	6.2	5.6	10.2	9.4
512	19	18	94.7	18	11	7	0	0	0	0	100.0	18	11	7	100.0	7.7	7.4	11.8	11.0
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	15.2	14.7	96.7	14.7	7.0	7.7	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	14.6	6.9	7.7	99.5	6.9	6.6	11.3	10.8
S.D.	3.8	3.8	4.8	3.8	3.1	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	3.1	2.2	1.8	0.8	0.7	1.9	1.8

Sex ratio : 0.91 (Total number of male pups on day 0 of lactation / Total number of female pups on day 0 of lactation = 84 / 92 ).

T : Total. M : Male. F : Female. SI : Sex was indistinction.

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.

Appendix 23-2 Individual litter results of rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

[100 mg/kg/day ]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation							Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
				Live pups				Dead pups				T	M	F		On day 0		On day 4	
				T	M	F	SI	M	F	M						F	M	F	
513	17	16	94.1	15	6	9	1	0	1	0	93.8	15	6	9	100.0	7.8	7.2	11.8	11.0
514	14	14	100.0	14	4	10	0	0	0	0	100.0	13	4	9	92.9	6.6	6.2	10.9	10.3
515	17	15	88.2	15	7	8	0	0	0	0	100.0	15	7	8	100.0	7.1	6.6	11.4	10.7
516	18	17	94.4	17	6	11	0	0	0	0	100.0	17	6	11	100.0	6.1	5.9	9.9	9.5
517	17	17	100.0	17	8	9	0	0	0	0	100.0	17	8	9	100.0	7.8	6.3	9.5	8.8
518	16	14	87.5	14	9	5	0	0	0	0	100.0	14	9	5	100.0	7.7	7.2	11.4	10.9
519	UC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
520	15	12	80.0	12	4	8	0	0	0	0	100.0	10	3	7	83.3	7.4	7.5	14.6	14.5
521	15	14	93.3	14	6	8	0	0	0	0	100.0	13	5	8	92.9	6.3	6.2	10.6	10.6
522	17	16	94.1	15	6	9	1	1	0	0	93.8	15	6	9	100.0	6.4	5.9	10.1	9.8
523	19	19	100.0	19	9	10	0	0	0	0	100.0	18	9	9	94.7	6.0	5.7	9.2	9.5
524	15	15	100.0	15	7	8	0	0	0	0	100.0	15	7	8	100.0	7.4	7.1	11.1	11.1
No.	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Mean	16.4	15.4	93.8	15.2	6.5	8.6	0.2	0.1	0.1	0.0	98.9	14.7	6.4	8.4	96.7	7.0	6.5	11.0	10.6
S.D.	1.5	1.9	6.5	1.9	1.7	1.6	0.4	0.3	0.3	0.0	2.5	2.2	1.9	1.5	5.4	0.7	0.6	1.5	1.5

Sex ratio : 0.76(Total number of male pups on day 0 of lactation / Total number of female pups on day 0 of lactation = 73/ 96 ).

T : Total. M : Male. F : Female. SI : Sex was indistinction.

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.

UC : Unsuccessful copulation.

Appendix 23-3 Individual litter results of rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 300 mg/kg/day ]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation							Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
				Live pups			Dead pups					T	M	F		On day 0		On day 4	
				T	M	F	T	M	F	SI						M	F	M	F
525	15	15	100.0	15	9	6	0	0	0	0	100.0	15	9	6	100.0	6.4	5.9	10.8	9.8
526	18	18	100.0	18	6	12	0	0	0	0	100.0	18	6	12	100.0	6.5	6.3	9.4	8.8
527	15	14	93.3	14	6	8	0	0	0	0	100.0	14	6	8	100.0	6.8	6.7	10.3	9.9
528	16	13	81.3	13	8	5	0	0	0	0	100.0	13	8	5	100.0	6.9	6.7	11.4	11.2
529	13	12	92.3	12	3	9	0	0	0	0	100.0	12	3	9	100.0	7.0	6.8	11.6	11.5
530	16	15	93.8	15	10	5	0	0	0	0	100.0	15	10	5	100.0	6.6	6.5	9.9	9.8
531	NP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
532	15	15	100.0	15	10	5	0	0	0	0	100.0	15	10	5	100.0	6.9	6.5	10.7	10.5
533	17	16	94.1	16	9	7	0	0	0	0	100.0	15	9	6	93.8	7.1	6.7	10.9	10.5
534	17	16	94.1	16	8	8	0	0	0	0	100.0	15	8	7	93.8	7.0	6.3	11.3	10.1
535	14	13	92.9	13	4	9	0	0	0	0	100.0	13	4	9	100.0	8.5	7.8	13.6	13.2
536	16	16	100.0	16	10	6	0	0	0	0	100.0	16	10	6	100.0	6.5	6.2	10.2	9.6
No.	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Mean	15.6	14.8	94.7	14.8	7.5	7.3	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	14.6	7.5	7.1	98.9	6.9	6.6	10.9	10.4
S.D.	1.4	1.7	5.5	1.7	2.5	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	2.5	2.2	2.5	0.6	0.5	1.1	1.2

Sex ratio : 1.04 (Total number of male pups on day 0 of lactation / Total number of female pups on day 0 of lactation = 83 /80 ).

T : Total. M : Male. F : Female. SI : Sex was indistinction.

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Appendix 23-4 Individual litter results of rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 1000 mg/kg/day ]

Parental female number	No. of implantation sites	No. of pups born	Delivery index (%)	No. of pups on day 0 of lactation							Live birth index (%)	No. of live pups on day 4 of lactation			Viability index (%)	Mean body weight of live pups (g)			
				Live pups				Dead pups				T	M	F		On day 0		On day 4	
				T	M	F	SI	M	F	M						F	M	F	
537	14	14	100.0	14	5	9	0	0	0	0	100.0	14	5	9	100.0	7.1	6.5	11.1	10.4
538	16	15	93.8	15	6	9	0	0	0	0	100.0	15	6	9	100.0	6.8	6.6	10.9	10.5
539	14	14	100.0	14	7	7	0	0	0	0	100.0	14	7	7	100.0	6.7	6.4	10.7	10.3
540	15	15	100.0	15	7	8	0	0	0	0	100.0	14	6	8	93.3	6.7	6.4	11.5	11.1
541	16	16	100.0	16	11	5	0	0	0	0	100.0	16	11	5	100.0	7.1	6.9	11.2	10.9
542	16	15	93.8	15	8	7	0	0	0	0	100.0	15	8	7	100.0	6.9	6.3	10.9	9.9
543	14	14	100.0	14	7	7	0	0	0	0	100.0	14	7	7	100.0	6.9	6.3	11.6	10.6
544	15	15	100.0	15	9	6	0	0	0	0	100.0	15	9	6	100.0	8.1	7.8	12.6	11.8
545	15	14	93.3	13	7	6	1	0	1	0	92.9	13	7	6	100.0	7.2	6.8	12.3	11.8
546	19	17	89.5	17	8	9	0	0	0	0	100.0	17	8	9	100.0	7.1	6.7	11.2	10.3
547	14	14	100.0	14	5	9	0	0	0	0	100.0	14	5	9	100.0	8.3	7.5	13.9	12.5
548	18	17	94.4	17	7	10	0	0	0	0	100.0	17	7	10	100.0	7.6	6.9	12.4	11.0
No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	15.5	15.0	97.1	14.9	7.3	7.7	0.1	0.0	0.1	0.0	99.4	14.8	7.2	7.7	99.4	7.2	6.8	11.7	10.9
S.D.	1.6	1.1	3.8	1.2	1.7	1.6	0.3	0.0	0.3	0.0	2.0	1.3	1.7	1.6	1.9	0.5	0.5	0.9	0.8

Sex ratio : 0.94 (Total number of male pups on day 0 of lactation / Total number of female pups on day 0 of lactation = 87 / 93 ).

T : Total. M : Male. F : Female. SI : Sex was indistinction.

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100.

Appendix 24-1 Individual external findings of pups from pregnant rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 0 mg/kg/day ]

Parental female number	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	17	11	16	15	12	17	14	18	16	5	17	18	176	12	—	—
No. of pups examined																
Total	17	11	16	15	12	17	14	18	16	5	17	18	176	12	—	—
Live	17	11	16	15	12	17	14	18	16	5	17	18	176	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

Appendix 24-2 Individual external findings of pups from pregnant rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 100 mg/kg/day ]

Parental female number	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	16	14	15	17	17	14	UC	12	14	16	19	15	169	11	—	—
No. of pups examined																
Total	16	14	15	17	17	14	—	12	14	16	19	15	169	11	—	—
Live	15	14	15	17	17	14	—	12	14	15	19	15	167	—	—	—
Dead	1	0	0	0	0	0	—	0	0	1	0	0	2	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	—	2	0	0	0	0	2	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(16.7)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	11	(1.5)	(5.0)
Live	0	0	0	0	0	0	—	2	0	0	0	0	2	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
External malformations Dwarf																
Total	0	0	0	0	0	0	—	2	0	0	0	0	2	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(16.7)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	11	(1.5)	(5.0)
Live	0	0	0	0	0	0	—	2	0	0	0	0	2	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—

UC : Unsuccessful copulation.

Appendix 24-3 Individual external findings of pups from pregnant rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 300 mg/kg/day ]

Parental female number	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	15	18	14	13	12	15	NP	15	16	16	13	16	163	11	—	—
No. of pups examined																
Total	15	18	14	13	12	15	—	15	16	16	13	16	163	11	—	—
Live	15	18	14	13	12	15	—	15	16	16	13	16	163	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	11	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Appendix 24-4 Individual external findings of pups from pregnant rats treated orally with  
4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt  
in the reproduction/developmental toxicity screening test

[ 1000 mg/kg/day ]

Parental female number	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	14	15	14	15	16	15	14	15	14	17	14	17	180	12	—	—
No. of pups examined																
Total	14	15	14	15	16	15	14	15	14	17	14	17	180	12	—	—
Live	14	15	14	15	16	15	14	15	13	17	14	17	179	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	—	—	—
No. of pups with external malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0)	(0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

Appendix 25-1 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt with the reproduction/development toxicity screening test

[ 0 mg/kg ]

Parental female number	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	17	11	16	15	12	17	14	18	16	5	17	18	176	12	—	—
No. of pups examined																
Total	17	11	16	15	12	17	14	18	16	5	17	18	176	12	—	—
Live	17	11	16	15	12	17	14	18	15	5	17	18	175	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.0)	(0.0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	—	—	—
(%)	(5.9)	(0)	(6.3)	(0)	(0)	(0)	(7.1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(1.6)	(2.9)
Live	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Visceral variations																
Thymic remnant in neck																
Total	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(6.3)	(0)	(0)	(0)	(7.1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(1.1)	(2.6)
Live	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Persistent left umbilical artery																
Total	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
(%)	(5.9)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.5)	(1.7)
Live	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

Appendix 25-2 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt with the reproduction/development toxicity screening test [ 100 mg/kg ]

Parental female number	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	16	14	15	17	17	14	UC	12	14	16	19	15	169	11	—	—
No. of pups examined																
Total	16	14	15	17	17	14	—	10 <sup>a</sup>	13 <sup>b</sup>	16	19	15	166	11	—	—
Live	15	13	15	17	17	14	—	10	13	15	18	15	162	—	—	—
Dead	1	1	0	0	0	0	—	0	0	1	1	0	4	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(0)	(0)	(0)	(0)	—	—	11	(0.0)	(0.0)
Live	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	(0)	(0)	(0)	(0)	—	—	10	(0.0)	(0.0)
Live	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	0	—	—	—

a : Two pups were cannibalized. b : One pup was cannibalized. UC : Unsuccessful copulation.

Appendix 25-3 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt with the reproduction/development toxicity screening test

[ 300 mg/kg ]

Parental female number	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	15	18	14	13	12	15	NP	15	16	16	13	16	163	11	—	—
No. of pups examined																
Total	15	18	14	13	12	15	—	15	16	16	13	16	163	11	—	—
Live	15	18	14	13	12	15	—	15	15	15	13	16	161	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	1	1	0	0	2	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	—	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	—	—	—
Live	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	—	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)	0 (0)	0 (0)	1	—	—	—
Live	0	0	0	0	0	0	—	0	0	1	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Persistent left umbilical artery																
Total (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	—	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)	0 (0)	0 (0)	1	—	—	—
Live	0	0	0	0	0	0	—	0	0	1	0	0	1	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

Appendix 25-4 Individual visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with 4-amino-5-hydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt with the reproduction/development toxicity screening test [ 1000 mg/kg ]

Parental female number	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	Total	No.	Mean	S.D.
No. of pups born	14	15	14	15	16	15	14	15	14	17	14	17	180	12	—	—
No. of pups examined																
Total	14	15	14	15	16	15	14	15	14	17	14	17	180	12	—	—
Live	14	15	14	14	16	15	14	15	13	17	14	17	178	—	—	—
Dead	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	—	—	—
No. of pups with visceral malformations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.0)	(0.0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
No. of pups with visceral variations																
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
(%)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	—	12	(0.0)	(0.0)
Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—