

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸の
ラットにおける28日間反復投与毒性試験

—最終報告書—

試験実施施設 : 株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所

目 次

	頁
要 約	1
緒 言	2
試験材料及び方法	2
試験成績	7
考 察	10
参考文献	11
Fig. 1 Mean body weight changes in male rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	12
Fig. 2 Mean body weight changes in female rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	13
Fig. 3 Mean food consumption in male rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	14
Fig. 4 Mean food consumption in female rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	15
Table 1 Body weights in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	16
Table 2 Food consumption in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	17

Table 3	Urinary findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days	-----	18
Table 4	Urinary findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	-----	21
Table 5	Hematological findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days	-----	24
Table 6	Hematological findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	-----	27
Table 7	Biochemical findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days	-----	30
Table 8	Biochemical findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	-----	33
Table 9	Necropsy findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days	-----	36
Table 10	Necropsy findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	-----	37
Table 11	Organ weights in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days	-----	38
Table 12	Organ weights in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period	-----	41
Table 13	Histopathological findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days	-----	44

要 約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸の0(対照), 250, 500及び1000mg/kgを1群雌雄各6匹のCrj:CD(SD系)ラットに28日間反復経口投与する毒性試験を実施し, 以下の結果を得た。なお, 対照群及び1000mg/kg群にはそれぞれ雌雄各6匹の14日間回復群も設けた。

一般状態, 体重, 摂餌量, 尿検査, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 器官重量, 剖検及び病理組織学的検査のいずれにおいても投与に起因した変化はみられず, 本試験条件下における無影響量は1000mg/kgと考えられた。

緒 言

スルホン酸系化合物の毒性は一般に弱く、LD₅₀値は1000mg/kg以上で、多くの化合物では5000mg/kgを上回ると報告されている¹⁾。7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸についても、ラットでのLD₅₀値は5000mg/kgを上回ると言われているが、反復投与に関する報告はみあたらない¹⁾。

今回、OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸を雌雄ラットに28日間反復経口投与するとともに、投与終了後に14日間の休業期間を設けて、その毒性及び回復性について検討したので報告する。

試験材料及び方法

1. 被験物質

より提供された7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸(純度91.8%, Lot No.)を試験に使用した。本被験物質は水及びアセトンにほとんど不溶の灰白色粉末であり、水、熱、光などにほぼ安定である(添付資料1-1)。また、投与終了後、上記の供給源にて分析を行い、試験期間中の被験物質の安定性について確認した(添付資料1-2)。媒体にはアラビアゴム(和光純薬工業株式会社, Lot No.PTG0424)を注射用水に溶解して5%水溶液としたものを使用した。5%アラビアゴム水溶液は週1回以上の頻度で調製し、使用時まで被験物質室の冷蔵庫にて保管した。なお、被験物質は室温、遮光下で、アラビアゴムの原末は室温で、それぞれ被験物質室の保管庫に保管した。

2. 使用動物及び飼育条件

5週齢のCrj:CD(SD系)ラット(日本チャールス・リバー株式会社)を雌雄各45匹購入し、8日間の検疫馴化を行った。この間に、全例について一般状態の観察及び体重測定を実施するとともに、雌雄各3匹を抜粋して剖検し、異常がないことを確認したのち、雌雄各36匹を選んで6週齢で試験に使用した。投与開始時の体重は、雄が208.4~228.6g,

雌が137.6～165.0gであった。動物は、温度 24 ± 2 °C(許容範囲18～28°C)、湿度 55 ± 10 % (許容範囲30～70%)、照明12時間(午前7時～午後7時)及び換気回数13回/時に設定したバリアーシステム飼育室(88番)でステンレススチール製ハンガーケージ(W260×H200×D380mm)に、検疫馴化期間中は1ケージ当たり3匹ずつ、群分け後は個別に収容して飼育した。なお、試験期間中の温度の実測値は最高25°C、最低21°C、湿度の実測値は最高64%、最低50%であった。飼料は高圧蒸気滅菌処理した固型飼料(MF、オリエンタル酵母工業株式会社)を、飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加(約2 ppm)した井水を自動給水装置によりそれぞれ自由に摂取させた。飼料については財団法人 日本食品分析センターにて、また、飲水については株式会社鶴城 南九科研センターにて分析を行い、いずれも許容基準に適合していることを確認した。飼育器材は高圧蒸気滅菌したものを使用し、ケージは2週間に1回以上、受皿は週3回以上、ラックは4週間に1回以上交換するとともに、飼育室は毎日清掃し、消毒薬を浸したモップで清拭した。

3. 試験群構成、投与量設定の根拠及び群分け

試験群構成を下表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	性別	使用動物数	動物番号
対照群	0	♂	6+6*	301～306, 307*～312*
		♀	6+6*	341～346, 347*～352*
低用量群	250	♂	6	313～318
		♀	6	353～358
中間用量群	500	♂	6	319～324
		♀	6	359～364
高用量群	1000	♂	6+6*	325～330, 331*～336*
		♀	6+6*	365～370, 371*～376*

*：回復試験に使用した動物

投与量は、先に当研究所で実施した2週間反復投与毒性予備試験(投与量：0, 250, 500及び1000mg/kg)の結果から設定した。すなわち、当該試験において、1000mg/kg投与でも被験物質による毒性発現がみられなかったことから、本試験での投与量は、化審法ガイドラインに準じて1000mg/kgを高用量とし、以下公比2で除した500及び250mg/kgの計3用量を設定した。

試験群は、上記3用量に対照を加え計4群とした。1群当たりの動物数は、投与期間終了時の剖検例として各群とも雌雄各6匹とし、更に、対照群及び1000mg/kg群については回復期間終了時の剖検例として雌雄各6匹を設けた。

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

4. 投与経路、投与方法、投与期間及び回復期間

投与経路は、化審法ガイドラインで指定されており、また、予想されるヒトへの曝露経路の一つである経口投与とした。投与には胃管を用い、1日1回投与で28日間反復投与した。投与容量は10ml/kgとし、個体ごとの投与液量は最新の体重を基に算出した。対照群には5%アラビアゴム水溶液を同様に投与した。

回復試験に供した動物は、投与期間終了後に14日間無処置で飼育した。

5. 被験物質と媒体との混合物調製法

被験物質を各濃度ごとに必要量秤量して磨砕後、5%アラビアゴム水溶液を徐々に加えて懸濁し、2.5, 5及び10W/V%懸濁液を調製した。調製は週1回以上の頻度で、1日分ずつ別々に行い、調製した懸濁液は飼育区域内の検体保管室にて室温、遮光下に保管した。また、初回調製時に、各濃度の懸濁液について被験物質の濃度確認を実施し、設定濃度の許容範囲(±10%以内)にあることを確認した(添付資料2)。なお、本調製法による0.1, 1及び10W/V%懸濁液は、室温、遮光下で調製後11日間安定であり、均一性についても問題ないことが確認されている(添付資料3)。

6. 観察、検査、分析及び測定の種類及び方法

以下の項目を、その時点で生存する全例について実施した。

1) 一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定

投与期間中は毎日投与前及び投与後の計2回、回復期間中は毎日午前及び午後の計2回、一般状態及び死亡の有無を観察した。また、体重及び摂餌量を投与期間及び回復期間を通して週2回の割合で測定し、更に、体重は投与開始日の投与前にも測定した。

2) 尿検査

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

3) 血液学的検査

投与期間終了後及び回復期間終了後に、すべての動物を18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム30mg/kgを腹腔内投与して麻酔し、開腹後、腹部大静脈から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2K処理(EDTA-2K加血液)して多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780型, 東亜医用電子株式会社)を用いて、白血球数(電気抵抗検出方式), 赤血球数(電気抵抗検出方式), ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法), ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)及び血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、赤血球数, ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の測定結果を基にWintrobeの赤血球恒数[平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球血色素量(MCH)及び平均赤血球血色素濃度(MCHC)]を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、May-Grünwald-Giemsa染色を施して白血球百分比を算出するとともに、網状赤血球率検査用のニュー

メチレンブルー超生体染色標本を作製して保管した。また、3.8%クエン酸ナトリウム加血液を3000回転/分で15分間遠心分離し、得られた血漿を用いて全自動血液凝固測定装置(Sysmex CA-5000型、東亜医用電子株式会社)により、プロトロンビン時間(散乱光検出方式)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT, 散乱光検出方式)を測定した。

4)血液生化学的検査

血液学的検査と同時に採取したすべての動物の血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(736-10型、株式会社日立製作所)により、総蛋白質(T.protein, ビウレット法), アルブミン(BCG法), A/G比(総蛋白質及びアルブミンより算出), 総ビリルビン(T.bilirubin, アルカリアゾビリルビン法), GOT(Karmen法), GPT(Wróblewski-LaDue法), γ -グルタミルトランスアミナーゼ(γ -GTP, L- γ -グルタミル-DBHA基質法), アルカリ性フォスファターゼ(ALP, p-ニトロフェニルリン酸基質法), 総コレステロール(T.cholesterol, COD-DAOS法), トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法), リン脂質(酵素法・DAOS発色法), グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法), 尿素窒素(BUN, ウレアーゼ-G 6 PDH法), クレアチニン(Jaffé法), 無機リン(モリブデン酸直接法)及びカルシウム(Ca, OCPC法)を測定した。また、電解質分析装置(PVA- α III, 株式会社アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(Na, 電極法), カリウム(K, 電極法)及びクロール(Cl, 電量滴定法)を測定した。

5)剖検, 器官重量の測定及び病理組織学的検査

投与期間終了後及び回復期間終了後に、すべての動物について採血を行ったのち、外側腸骨動脈を切断して放血死させ、解剖して諸器官及び組織の肉眼的観察を行った。剖検後、脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣及び卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに、剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。重量測定器官に加え、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、膵臓、胃、膀胱、大腿骨(骨髄を含む)及び肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。なお、10%中性緩衝ホルマリン溶液による

固定に先だって、眼球は2.5%グルタルアルデヒド溶液で、また、精巢はブアン液でそれぞれ前固定した。投与期間終了時の対照群及び1000mg/kg群の肝臓、脾臓、心臓、腎臓、副腎及び肉眼的異常部位については、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H E)染色を施して光学顕微鏡下で観察した。その結果、被験物質投与による変化がなかったため、その他の試験群については肉眼的異常部位のみの病理組織学的検査を行い、回復期間終了時については、採取した器官の保存のみにとどめた。

7. 統計学的処理

体重、摂餌量、尿検査(定性反応は除く)、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量及び体重比器官重量について、各群ごとに平均値と標準偏差を求め、Bartlett法により分散の均一性を検定した。分散が均一な場合は一元配置型の分散分析を行い、この解析で群間に有意差が認められ、かつ各群の例数が同じ場合はDunnett法により、異なる場合はScheffé法により対照群に対する各群の一对比較検定を行った。分散が均一でない場合はKruskal-Wallis法によって順位検定を行い、この検定で群間に有意差が認められ、かつ各群の例数が同じ場合はDunnett型の、異なる場合はScheffé型的一对比較検定を行った。上述の分散分析あるいはKruskal-Wallis法による順位検定で群間に有意差が認められなかった場合は、各群間の多重比較は行わなかった。なお、いずれの場合も有意水準は5%とした。

試 験 成 績

1. 一般状態

投与4週目に、1000mg/kg群の雄1例で上顎切歯先端部の欠損がみられた。同群の雌及びその他の試験群では一般状態に変化はなかった。

2. 体重

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

投与期間及び回復期間を通して、雌雄とも全投与群が対照群と同様な体重推移を示した。

3. 摂餌量

摂餌量をFig.3及び4, Table 2並びにAppendix 3及び4に示した。

投与4週目に、1000mg/kg群の雄で一過性の摂餌量の軽微な増加がみられた。同群の雌並びにその他の投与群の摂餌量は対照群と同様であった。

4. 尿検査

投与4週目の検査結果をTable 3並びにAppendix 5及び6に、回復2週目の検査結果をTable 4並びにAppendix 7及び8にそれぞれ示した。

投与4週目の検査において、500mg/kg群の雄で尿比重の軽微な上昇がみられた。同群の雌並びにその他の投与群では、対照群との差はみられなかった。

回復2週目の検査では、対照群と1000mg/kg群との差はみられなかった。

5. 血液学的検査

投与期間終了時の検査結果をTable 5並びにAppendix 9及び10に、回復期間終了時の検査結果をTable 6並びにAppendix 11及び12にそれぞれ示した。

投与期間終了時及び回復期間終了時ともに、いずれの投与群においても対照群との差はみられなかった。

6. 血液生化学的検査

投与期間終了時の検査結果をTable 7並びにAppendix 13及び14に、回復期間終了時の検査結果をTable 8並びにAppendix 15及び16にそれぞれ示した。

投与期間終了時には、いずれの投与群においても対照群との差はみられなかった。

回復期間終了時には、1000mg/kg群の雄でGOTの上昇、同群の雌でカルシウムの減少がみられたが、いずれも軽微な変動であった。

7. 剖検

投与期間終了時の検査結果をTable 9並びにAppendix 17及び18に、回復期間終了時の検査結果をTable 10並びにAppendix 19及び20にそれぞれ示した。

投与期間終了時に、1000mg/kg群の雄1例で上顎切歯先端部の欠損がみられ、同群の他の雄1例で右腎臓に単発性の灰白色斑及び軽度の腎盂拡張が認められた。右腎臓の同

程度の腎盂拡張は250mg/kg群の雄2例でもみられ、このうち1例には左精巣の軽度の萎縮も認められた。投与期間終了時には、この他の変化はみられなかった。

回復期間終了時には、対照群及び1000mg/kg群ともに変化はみられなかった。

8. 器官重量

投与期間終了時の検査結果をTable 11並びにAppendix 21及び22に、回復期間終了時の検査結果をTable 12並びにAppendix 23及び24にそれぞれ示した。

投与期間終了時に、全投与群の雌で心臓の相対重量の減少がみられた。また、このうち250及び1000mg/kg群では心臓の絶対重量の減少がみられ、500mg/kg群の雌でも同様の傾向が認められた。

回復期間終了時には、1000mg/kg群の雄で肺の絶対重量の増加及び心臓の相対重量の減少がみられた。

9. 病理組織学的検査

投与期間終了時の検査結果をTable 13並びにAppendix 25及び26に示した。

250mg/kg群の雄2例及び1000mg/kg群の雄1例で腎臓の腎盂拡張(Photo.1及び2)がみられた。このうち、1000mg/kg群の雄1例では限局性の近位尿細管上皮の好塩基性化、遠位尿細管の拡張及び間質へのリンパ球浸潤、並びに乳頭部の石灰沈着(Photo.2)がみられ、250mg/kg群の雄1例では精巣の萎縮(Photo.3)が認められた。このほかには、肝臓、脾臓、心臓、腎臓及び副腎に異常はみられなかった(Photo.4~13)。

考 察

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、7-アミノ-4-ヒドロキシー-2-ナフトレンスルホン酸の0(対照)、250、500及び1000mg/kgを雌雄ラットに28日間反復経口投与する毒性試験を実施するとともに、対照群及び1000mg/kg群については投与終了後に14日間の休業期間を設ける回復試験を実施した。

一般状態では、1000mg/kg群の雄1例で上顎切歯先端部の欠損がみられたが、偶発的変化と考えられ、被験物質投与による症状発現はなかった。また、体重も全投与群が対照群と同様な推移を示し、投与の影響はみられなかった。摂餌量では、1000mg/kg群の雄で増加がみられたが、一過性の軽微な変動であり、毒性学的意義はないものと考えられた。

臨床検査では、投与期間終了時の血液学的検査及び血液生化学的検査ともに変化は認められなかった。回復期間終了時には、1000mg/kg群の雄でGOTの上昇及び同群の雌で血清カルシウムの減少が認められたが、いずれも生理的変動内での軽微な差であり、また、投与期間終了時にはみられないことから、投与との関連はないものと考えられた。このほか、投与4週目の尿検査で500mg/kg群の雄に尿比重の上昇がみられたが、同群の雌及び1000mg/kg群には同様の変動はなく、投与との関連はないものと考えられた。

器官重量では、投与期間終了時に全投与群の雌で心臓の絶対及び相対重量の減少あるいは減少傾向が認められた。しかし、軽微な変動であり、投与量と変化の程度に一定の傾向がないことから、投与とは関連のない偶発的な変動と考えられ、組織学的にも異常はみられなかった。回復期間終了時には、一部の器官で対照群との有意な差がみられたが、絶対重量あるいは相対重量のいずれか一方のみの軽微な変動であり、投与との関連はないものと考えられた。

病理学的検査では、250mg/kg群の雄2例及び1000mg/kg群の雄1例で腎臓の腎盂拡張が認められた。このうち1000mg/kg群の雄1例は尿細管上皮の好塩基性化、尿細管の拡張、間質へのリンパ球浸潤及び乳頭部の石灰沈着を伴い、また、250mg/kg群の雄1例には精巢の萎縮が認められた。これらの変化は、正常ラットでしばしば観察される変化であり、その出現頻度にも投与量との関連がなかったことから、いずれも自然発生の変化と考えられた。

上述したように、7-アミノ-4-ヒドロキシー-2-ナフトレンスルホン酸投与に起因した変化はいずれの検査においてもみられず、本試験条件下での無影響量は1000mg/kgと考えられた。

参 考 文 献

- 1) Greim H. et al.(1994): Toxicity and ecotoxicity of sulfonic acids: structure-activity relationship. Chemosphere, Vol.28(12), PP2203-2236.

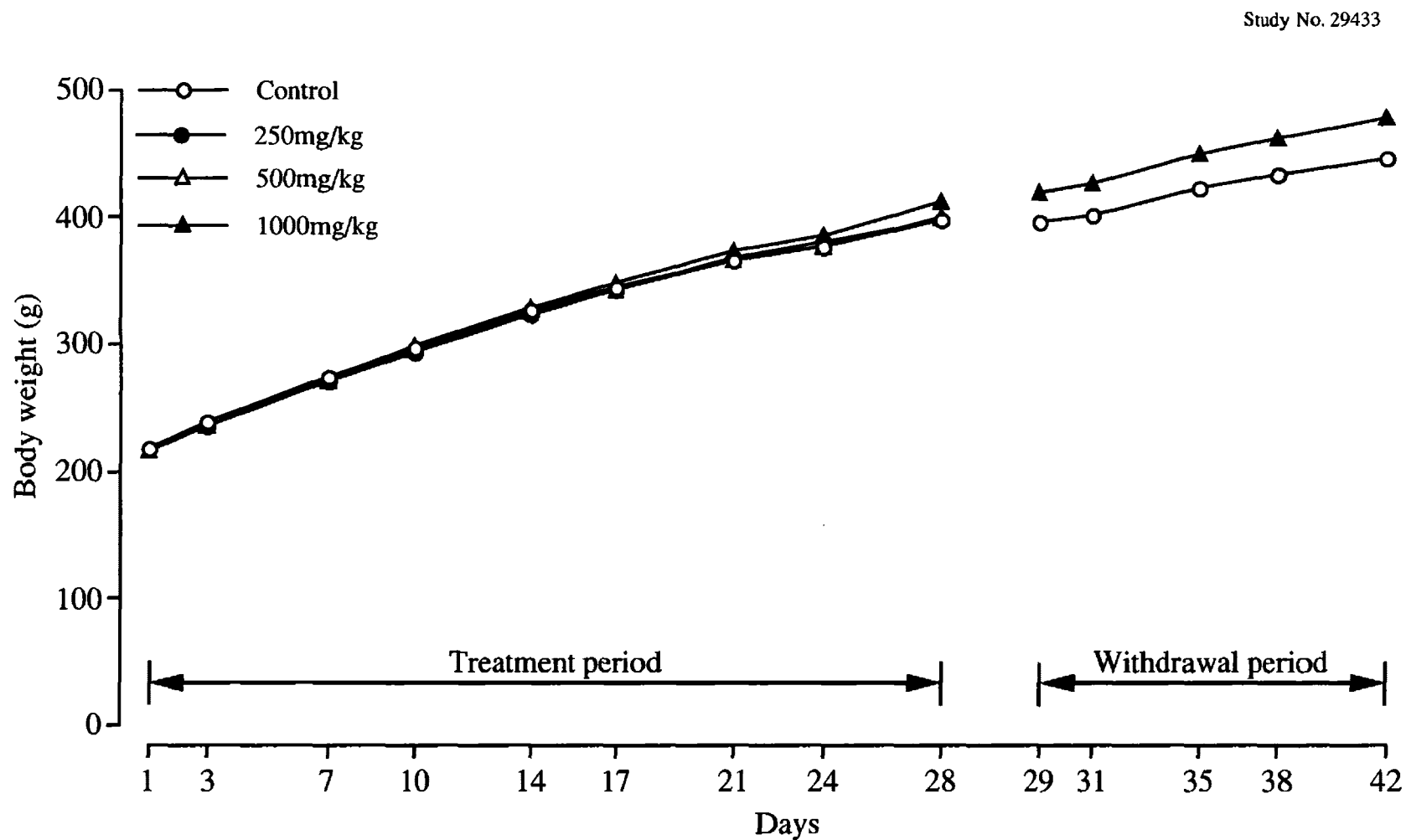


Fig. 1 Mean body weight changes in male rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

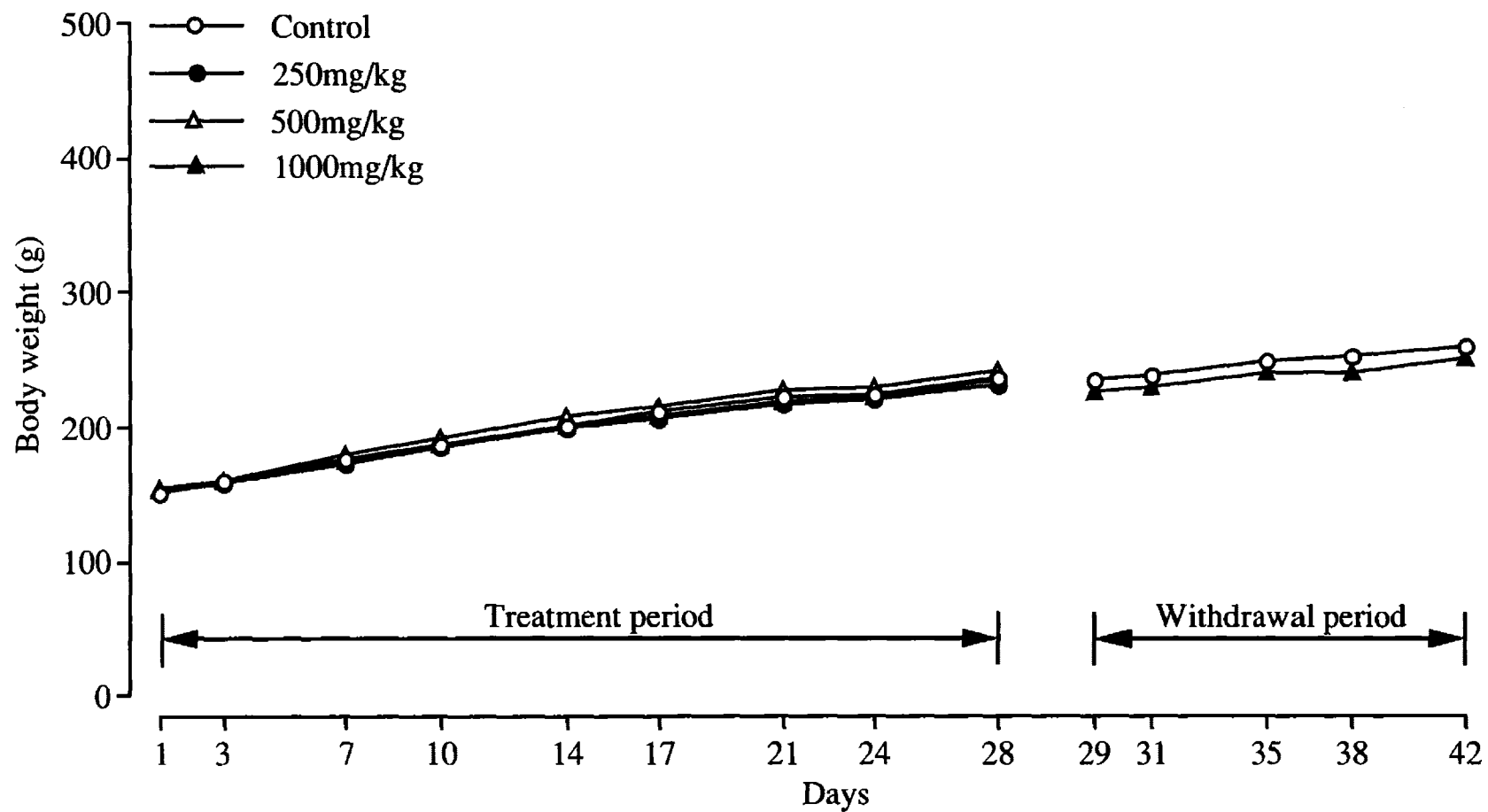


Fig. 2 Mean body weight changes in female rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

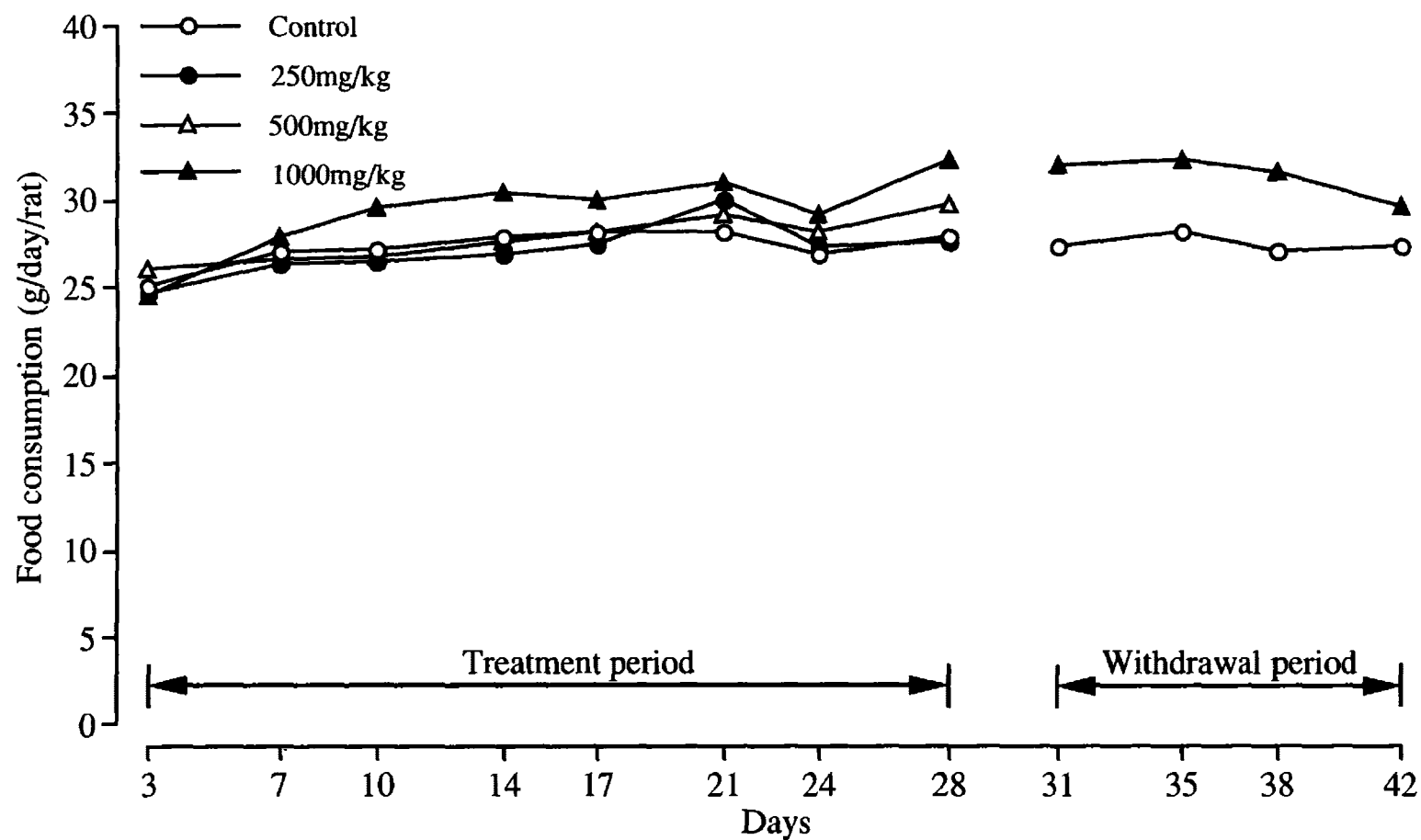


Fig. 3 Mean food consumption in male rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

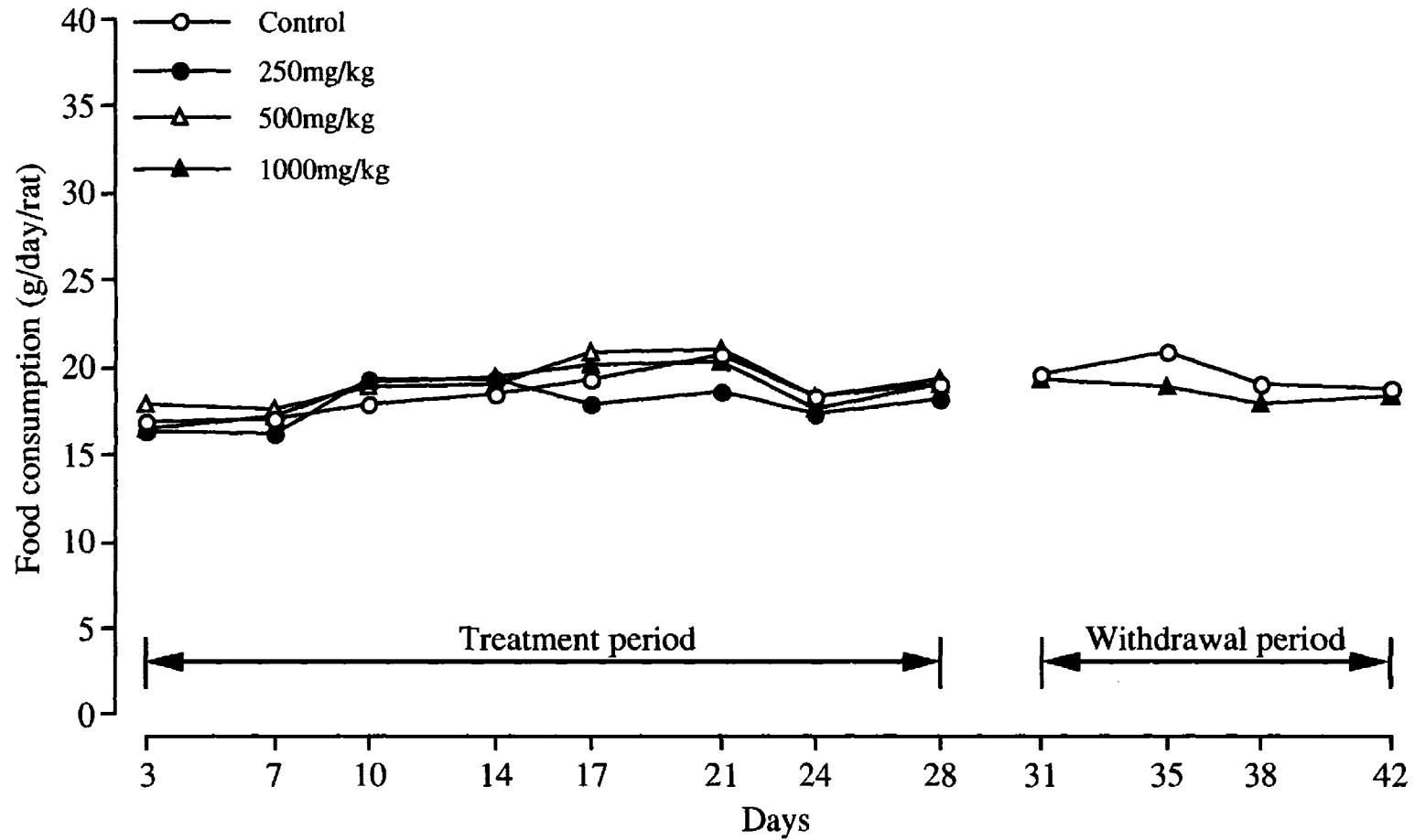


Fig. 4 Mean food consumption in female rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

Table 1 Body weights in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Body weight (g) on day														
		1	3	7	10	14	17	21	24	28	29	31	35	38	42	
Male	Control	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6	6	6
		Mean	217.4	237.5	273.4	296.7	327.0	344.6	365.6	375.1	396.7	395.8	401.3	422.8	432.3	446.0
		S.D.	±6.3	±7.4	±8.9	±12.5	±16.5	±19.5	±22.6	±22.3	±23.9	±22.5	±22.9	±25.4	±25.1	±25.0
	250mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6				
		Mean	216.8	234.2	269.3	293.5	322.6	341.4	367.5	378.6	397.5					
		S.D.	±6.9	±8.0	±8.8	±11.4	±12.4	±15.2	±16.6	±15.8	±16.7					
	500mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6					
		Mean	215.0	235.2	270.0	294.9	324.2	343.0	365.6	375.0	398.9					
		S.D.	±6.3	±6.1	±7.6	±9.8	±14.0	±18.4	±21.7	±23.9	±24.2					
	1000mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6	6	6
		Mean	214.3	234.1	271.6	298.3	328.6	348.1	371.7	384.3	410.9	418.6	425.9	448.7	460.7	476.9
		S.D.	±4.6	±6.0	±9.5	±11.0	±15.0	±16.7	±19.2	±23.9	±23.1	±33.0	±34.0	±36.7	±37.5	±40.3
Female	Control	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6	6	6
		Mean	150.6	158.7	175.1	186.9	199.7	210.2	221.3	223.4	235.7	234.3	236.3	248.3	250.7	257.6
		S.D.	±7.5	±9.0	±11.1	±9.8	±11.4	±12.3	±15.4	±18.6	±20.9	±18.2	±17.3	±20.7	±19.8	±19.1
	250mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6					
		Mean	151.0	157.4	171.8	183.5	199.1	205.7	215.4	219.9	230.3					
		S.D.	±3.7	±6.5	±10.3	±7.4	±8.7	±10.4	±12.0	±12.2	±14.8					
	500mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6					
		Mean	154.1	159.9	178.3	190.8	206.9	214.5	225.9	227.7	240.0					
		S.D.	±6.1	±8.0	±7.1	±9.4	±11.4	±9.2	±12.0	±12.6	±16.3					
	1000mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6	6	6
		Mean	151.8	158.7	173.2	186.0	199.9	207.8	218.5	221.9	233.5	225.7	228.8	238.3	239.6	249.1
		S.D.	±6.3	±7.7	±9.2	±10.9	±13.2	±14.5	±15.9	±14.5	±16.8	±13.8	±15.6	±16.3	±19.0	±25.5

Table 2 Food consumption in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Date	Food consumption (g) on day											
			3	7	10	14	17	21	24	28	31	35	38	42
Male	Control	N	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6	6
		Mean	25.1	27.0	27.1	27.9	28.1	28.2	26.9	27.8	27.3	28.2	27.0	27.3
		S.D.	±1.6	±1.2	±2.3	±2.8	±2.5	±2.3	±2.8	±2.5	±2.6	±4.2	±3.3	±3.0
	250mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
		Mean	24.6	26.3	26.4	26.9	27.4	30.0	27.3	27.6				
		S.D.	±1.6	±1.4	±1.2	±2.2	±1.6	±1.9	±0.5	±1.2				
	500mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
		Mean	26.1	26.6	26.8	27.6	28.2	29.2	28.2	29.7				
		S.D.	±1.6	±2.3	±2.2	±2.1	±3.3	±3.0	±1.5	±3.1				
	1000mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6	6
		Mean	24.5	27.9	29.5	30.4	30.0	31.0	29.2	32.2**	31.9*	32.3	31.6	29.6
		S.D.	±1.8	±2.7	±3.0	±2.8	±2.4	±2.6	±4.6	±3.3	±4.1	±5.5	±4.6	±4.3
Female	Control	N	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6	6
		Mean	16.8	17.0	17.8	18.4	19.2	20.6	18.2	19.0	19.5	20.8	19.0	18.7
		S.D.	±2.0	±2.1	±1.8	±1.8	±1.6	±1.8	±3.3	±4.0	±1.1	±2.5	±2.4	±2.0
	250mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
		Mean	16.3	16.2	19.2	19.3	17.9	18.6	17.3	18.1				
		S.D.	±1.6	±2.3	±1.6	±1.6	±2.8	±3.2	±2.1	±2.8				
	500mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
		Mean	17.8	17.5	18.9	19.0	20.8	20.9	18.2	19.2				
		S.D.	±1.0	±1.0	±1.0	±2.1	±2.0	±1.4	±1.8	±4.0				
	1000mg/kg	N	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6	6
		Mean	16.5	17.2	19.1	19.4	20.1	20.2	17.5	19.0	19.2	18.8	17.9	18.2
		S.D.	±1.5	±1.5	±2.1	±1.7	±2.7	±2.4	±2.2	±2.6	±2.3	±1.7	±3.5	±4.4

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

Table 3 Urinary findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Urine volume (ml/24hr)	Osmotic pressure (Osm/kg)	Specific gravity	pH
Male	Control	12	19.9 ±6.0	1.130 ±0.287	1.036 ±0.009	8.0 ±0.1
	250mg/kg	6	16.8 ±2.8	1.250 ±0.195	1.042 ±0.006	7.8 ±0.3
	500mg/kg	6	13.4 ±5.9	1.511 ±0.306	1.052* ±0.011	8.2 ±0.3
	1000mg/kg	12	18.4 ±6.3	1.394 ±0.392	1.045 ±0.013	8.0 ±0.3
Female	Control	12	7.6 ±3.9	1.650 ±0.605	1.053 ±0.017	8.2 ±0.4
	250mg/kg	6	6.8 ±3.4	1.520 ±0.414	1.050 ±0.014	8.1 ±0.4
	500mg/kg	6	8.5 ±4.0	1.508 ±0.417	1.050 ±0.013	8.3 ±0.3
	1000mg/kg	12	7.3 ±4.8	1.910 ±0.695	1.060 ±0.020	8.3 ±0.5

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

Table 3 - continued Urinary findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Color			Protein			Glucose	Ketone body	Bilirubin	Occult blood				Urobilinogen (mg/dl)	
			PY	Y	YB	-	±	+	-	-	-	-	+	*	**	<1	1
Male	Control	12	10	2	0	3	6	3	12	12	12	11	1	0	0	11	1
	250mg/kg	6	2	4	0	1	5	0	6	6	6	6	0	0	0	6	0
	500mg/kg	6	1	4	1	2	1	3	6	6	6	4	0	0	2	6	0
	1000mg/kg	12	5	7	0	6	6	0	12	12	12	11	1	0	0	12	0
Female	Control	12	3	9	0	11	0	1	12	12	12	9	1	2	0	11	1
	250mg/kg	6	1	5	0	6	0	0	6	6	6	5	1	0	0	6	0
	500mg/kg	6	0	6	0	5	1	0	6	6	6	5	1	0	0	6	0
	1000mg/kg	12	1	11	0	7	4	1	12	12	12	11	1	0	0	9	3

Abbreviation: PY, pale yellow; Y, yellow; YB, yellowish brown.
Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; *, moderate; **, severe; ***, very severe.

Table 3 - continued Urinary findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Urinary sediment											
			Epithelial cells		Erythrocytes		Leucocytes		Casts	Crystals				
			-	+	-	+	-	+	-	-	+	#	#	
Male	Control	12	12	0	12	0	12	0	12		7	4	1	0
	250mg/kg	6	6	0	6	0	6	0	6		1	5	0	0
	500mg/kg	6	5	1	5	1	6	0	6		3	1	1	1
	1000mg/kg	12	12	0	12	0	11	1	12		3	3	5	1
Female	Control	12	12	0	12	0	11	1	12		11	1	0	0
	250mg/kg	6	6	0	6	0	6	0	6		5	0	1	0
	500mg/kg	6	6	0	6	0	5	1	6		2	1	2	1
	1000mg/kg	12	12	0	12	0	12	0	12		8	3	1	0

Grade signs are as follows.

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

Table 4 Urinary findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Urine volume (ml/24hr)	Osmotic pressure (Osm/kg)	Specific gravity	pH
Male	Control	6	18.0 ±6.4	1.443 ±0.424	1.046 ±0.013	7.8 ±0.3
	1000mg/kg	6	21.4 ±6.5	1.333 ±0.480	1.042 ±0.016	7.8 ±0.5
Female	Control	6	10.2 ±7.0	1.523 ±0.524	1.047 ±0.017	7.4 ±0.6
	1000mg/kg	6	9.9 ±4.5	1.600 ±0.654	1.049 ±0.020	7.8 ±0.3

Values are mean±S.D.

Table 4 - continued Urinary findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Color		Protein				Glucose	Ketone body	Bilirubin	Occult blood			Urobilinogen (mg/dl)	
			PY	Y	-	±	+	*	-	-	-	-	+	*	<1	1
Male	Control	6	2	4	1	3	1	1	6	6	6	5	1	0	4	2
	1000mg/kg	6	5	1	3	1	1	1	6	6	6	5	1	0	6	0
Female	Control	6	2	4	5	1	0	0	6	6	6	5	0	1	5	1
	1000mg/kg	6	2	4	2	3	1	0	6	6	6	6	0	0	2	4

Abbreviation: PY, pale yellow; Y, yellow.
Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; *, moderate; **, severe; ***, very severe.

Table 4 - continued Urinary findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

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

Grade signs are as follows.

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

Table 5 Hematological findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Leucocyte ($10^2/\mu\text{l}$)	Erythrocyte ($10^4/\mu\text{l}$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	MCV (fl)	MCH (pg)
Male	Control	6	64 ± 19	816 ± 37	14.8 ± 0.7	47.9 ± 2.0	100.3 ± 7.0	59 ± 2	18.2 ± 0.7
	250mg/kg	6	66 ± 19	797 ± 35	14.6 ± 0.3	47.0 ± 1.2	104.1 ± 7.6	59 ± 2	18.3 ± 0.7
	500mg/kg	6	77 ± 13	805 ± 26	14.5 ± 0.4	45.8 ± 1.0	101.7 ± 11.2	57 ± 2	18.0 ± 0.6
	1000mg/kg	6	65 ± 10	777 ± 31	14.7 ± 0.3	47.0 ± 1.8	108.1 ± 16.0	60 ± 1	18.9 ± 0.4
Female	Control	6	60 ± 7	780 ± 23	14.5 ± 0.5	45.6 ± 1.5	106.7 ± 6.3	59 ± 1	18.6 ± 0.2
	250mg/kg	6	56 ± 13	783 ± 20	14.4 ± 0.5	45.5 ± 1.5	112.9 ± 9.6	58 ± 1	18.3 ± 0.4
	500mg/kg	6	72 ± 11	780 ± 18	14.4 ± 0.4	45.8 ± 1.0	110.9 ± 9.8	59 ± 1	18.5 ± 0.4
	1000mg/kg	6	69 ± 21	780 ± 20	14.4 ± 0.4	45.4 ± 1.6	109.9 ± 9.6	58 ± 1	18.4 ± 0.3

Values are mean \pm S.D.

Table 5 - continued Hematological findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	MCHC (%)	Prothrombin time (sec)	APTT (sec)
Male	Control	6	31.0 ±0.4	16.9 ±4.1	24.7 ±1.8
	250mg/kg	6	31.0 ±0.7	17.7 ±1.6	24.5 ±2.3
	500mg/kg	6	31.7 ±0.2	13.9 ±1.3	22.6 ±0.7
	1000mg/kg	6	31.3 ±0.6	14.1 ±2.5	22.8 ±1.2
Female	Control	6	31.9 ±0.7	10.9 ±0.6	18.1 ±0.9
	250mg/kg	6	31.6 ±0.3	11.2 ±0.4	18.8 ±1.1
	500mg/kg	6	31.6 ±0.6	11.0 ±0.4	19.4 ±1.9
	1000mg/kg	6	31.7 ±0.8	11.1 ±0.4	20.1 ±0.7

Values are mean±S.D.

Table 5 - continued Hematological findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Differential leucocyte count					
			Eosinophil (%)	Neutro-Stab. (%)	Neutro-Seg. (%)	Lymphocyte (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)
Male	Control	6	0.5 ±0.5	0.2 ±0.4	10.8 ±4.6	87.2 ±5.5	0.0 ±0.0	1.3 ±0.8
	250mg/kg	6	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	11.0 ±6.0	88.3 ±5.9	0.0 ±0.0	0.7 ±1.2
	500mg/kg	6	0.8 ±1.2	0.0 ±0.0	10.3 ±3.9	87.5 ±3.0	0.0 ±0.0	1.3 ±1.2
	1000mg/kg	6	0.7 ±0.5	0.2 ±0.4	14.8 ±2.9	82.8 ±4.0	0.0 ±0.0	1.5 ±1.6
Female	Control	6	0.3 ±0.8	0.2 ±0.4	8.8 ±4.7	89.2 ±4.4	0.0 ±0.0	1.5 ±1.4
	250mg/kg	6	0.3 ±0.5	0.2 ±0.4	14.2 ±6.3	83.2 ±5.5	0.0 ±0.0	2.2 ±1.0
	500mg/kg	6	0.7 ±0.8	0.2 ±0.4	7.8 ±2.6	89.2 ±2.9	0.0 ±0.0	2.2 ±0.8
	1000mg/kg	6	0.2 ±0.4	0.0 ±0.0	12.3 ±4.1	85.8 ±3.9	0.0 ±0.0	1.7 ±1.2

Values are mean±S.D.

Table 6 Hematological findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Leucocyte ($10^2/\mu\text{l}$)	Erythrocyte ($10^4/\mu\text{l}$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	MCV (fl)	MCH (pg)
Male	Control	6	87 ± 23	806 ± 41	15.0 ± 0.7	46.7 ± 1.5	84.8 ± 37.1	58 ± 3	18.6 ± 0.9
	1000mg/kg	6	108 ± 46	831 ± 38	15.1 ± 0.6	47.5 ± 1.8	100.5 ± 10.4	58 ± 1	18.2 ± 0.5
Female	Control	6	44 ± 10	759 ± 41	13.8 ± 0.5	43.3 ± 1.5	107.1 ± 9.5	57 ± 2	18.2 ± 0.5
	1000mg/kg	6	47 ± 10	752 ± 20	13.8 ± 0.2	43.5 ± 1.0	104.3 ± 8.3	58 ± 1	18.4 ± 0.4

Values are mean \pm S.D.

Table 6 - continued Hematological findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	MCHC (%)	Prothrombin time (sec)	APTT (sec)
Male	Control	6	32.1 ±0.5	16.1 ±2.2	23.9 ±1.4
	1000mg/kg	6	31.8 ±0.6	16.1 ±2.4	23.9 ±1.1
Female	Control	6	31.9 ±0.8	10.8 ±0.5	18.9 ±0.9
	1000mg/kg	6	31.7 ±0.7	10.5 ±0.1	18.1 ±0.9

Values are mean±S.D.

Table 6 - continued Hematological findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Differential leucocyte count					
			Eosinophil (%)	Neutro-Stab. (%)	Neutro-Seg. (%)	Lymphocyte (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)
Male	Control	6	0.5 ±0.5	0.0 ±0.0	10.5 ±4.3	87.2 ±4.6	0.0 ±0.0	1.8 ±1.3
	1000mg/kg	6	0.3 ±0.5	0.0 ±0.0	12.8 ±3.6	86.0 ±3.4	0.0 ±0.0	0.8 ±0.8
Female	Control	6	1.5 ±1.4	0.2 ±0.4	17.8 ±5.0	79.3 ±5.2	0.0 ±0.0	1.2 ±1.2
	1000mg/kg	6	0.7 ±0.8	0.3 ±0.5	12.0 ±5.8	86.2 ±6.6	0.0 ±0.0	0.8 ±1.2

Values are mean±S.D.

Table 7 Biochemical findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	T.protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G ratio	T.bilirubin (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	γ -GTP (IU/l)	ALP (IU/l)
Male	Control	6	4.9 ± 0.2	3.5 ± 0.1	2.70 ± 0.26	0.0 ± 0.0	79 ± 10	22 ± 4	0.1 ± 0.2	325 ± 21
	250mg/kg	6	4.9 ± 0.1	3.5 ± 0.2	2.70 ± 0.24	0.0 ± 0.0	91 ± 15	23 ± 3	0.1 ± 0.2	357 ± 39
	500mg/kg	6	4.9 ± 0.2	3.6 ± 0.3	2.73 ± 0.49	0.0 ± 0.0	77 ± 9	19 ± 3	0.1 ± 0.1	330 ± 53
	1000mg/kg	6	4.8 ± 0.2	3.6 ± 0.2	2.81 ± 0.18	0.0 ± 0.0	92 ± 10	20 ± 3	0.1 ± 0.2	337 ± 27
Female	Control	6	5.2 ± 0.2	3.8 ± 0.2	2.68 ± 0.46	0.0 ± 0.0	87 ± 11	17 ± 2	0.1 ± 0.2	195 ± 49
	250mg/kg	6	5.1 ± 0.2	3.7 ± 0.3	2.84 ± 0.74	0.0 ± 0.0	94 ± 17	16 ± 2	0.2 ± 0.2	218 ± 47
	500mg/kg	6	5.1 ± 0.3	3.8 ± 0.3	2.83 ± 0.67	0.0 ± 0.0	101 ± 27	18 ± 4	0.2 ± 0.1	213 ± 24
	1000mg/kg	6	5.2 ± 0.4	3.8 ± 0.4	2.75 ± 0.44	0.0 ± 0.1	101 ± 13	21 ± 6	0.1 ± 0.1	216 ± 33

Values are mean \pm S.D.

Table 7 - continued Biochemical findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	T.cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	Phospholipids (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	IP (mg/dl)	Ca (mg/dl)
Male	Control	6	37 ±7	28 ±8	69 ±10	122 ±13	16.3 ±1.3	0.4 ±0.1	7.4 ±0.2	9.1 ±0.3
	250mg/kg	6	32 ±3	21 ±8	60 ±3	124 ±10	16.4 ±3.0	0.4 ±0.0	7.9 ±0.3	9.3 ±0.2
	500mg/kg	6	37 ±2	26 ±5	70 ±3	122 ±12	15.3 ±1.8	0.4 ±0.1	7.5 ±0.6	9.3 ±0.3
	1000mg/kg	6	34 ±10	29 ±19	65 ±15	130 ±14	14.7 ±1.2	0.4 ±0.1	7.2 ±0.4	9.1 ±0.2
Female	Control	6	48 ±10	13 ±2	88 ±15	123 ±16	20.3 ±2.2	0.5 ±0.1	8.2 ±0.8	9.7 ±0.2
	250mg/kg	6	47 ±7	12 ±2	85 ±9	113 ±4	22.4 ±2.4	0.5 ±0.1	9.2 ±1.0	9.6 ±0.3
	500mg/kg	6	44 ±13	11 ±2	80 ±15	111 ±14	22.7 ±4.0	0.5 ±0.1	8.5 ±0.5	9.6 ±0.4
	1000mg/kg	6	39 ±7	11 ±3	73 ±12	112 ±15	23.6 ±3.4	0.5 ±0.1	7.9 ±0.6	9.6 ±0.4

Values are mean±S.D.

Table 7 - continued Biochemical findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose	Number of animals	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
Male	Control	6	147.0 ±1.1	3.98 ±0.20	107.6 ±0.8
	250mg/kg	6	147.3 ±0.7	4.19 ±0.35	108.0 ±1.1
	500mg/kg	6	146.1 ±0.6	4.08 ±0.16	107.0 ±1.0
	1000mg/kg	6	146.6 ±0.4	4.09 ±0.18	106.6 ±2.3
Female	Control	6	146.5 ±0.4	4.19 ±0.22	108.1 ±1.0
	250mg/kg	6	147.1 ±0.5	4.33 ±0.26	108.3 ±1.0
	500mg/kg	6	146.2 ±0.6	4.27 ±0.25	108.0 ±1.4
	1000mg/kg	6	147.1 ±1.0	4.12 ±0.26	109.2 ±1.3

Values are mean±S.D.

Table 8 Biochemical findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	T.protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G ratio	T.bilirubin (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	γ -GTP (IU/l)	ALP (IU/l)
Male	Control	6	5.0 \pm 0.2	3.4 \pm 0.1	2.20 \pm 0.10	0.0 \pm 0.0	71 \pm 10	22 \pm 3	0.3 \pm 0.2	265 \pm 37
	1000mg/kg	6	5.0 \pm 0.2	3.5 \pm 0.1	2.57 \pm 0.60	0.0 \pm 0.0	86* \pm 12	26 \pm 3	0.4 \pm 0.2	267 \pm 17
Female	Control	6	5.1 \pm 0.2	3.7 \pm 0.1	2.68 \pm 0.35	0.0 \pm 0.0	78 \pm 6	17 \pm 3	0.5 \pm 0.2	152 \pm 19
	1000mg/kg	6	5.0 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2	2.78 \pm 0.45	0.0 \pm 0.0	78 \pm 12	17 \pm 4	0.4 \pm 0.2	161 \pm 12

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

Table 8 - continued Biochemical findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	T.cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	Phospholipids (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	IP (mg/dl)	Ca (mg/dl)
Male	Control	6	36 ±7	39 ±15	66 ±7	130 ±13	15.7 ±2.1	0.4 ±0.1	6.5 ±0.7	9.2 ±0.2
	1000mg/kg	6	34 ±5	42 ±9	66 ±8	126 ±14	17.8 ±1.9	0.5 ±0.1	6.6 ±0.4	9.2 ±0.2
Female	Control	6	39 ±8	14 ±3	75 ±11	107 ±7	18.1 ±1.7	0.4 ±0.1	6.3 ±0.4	9.5 ±0.3
	1000mg/kg	6	38 ±2	14 ±3	73 ±4	111 ±15	18.1 ±1.7	0.4 ±0.0	6.5 ±0.5	9.2* ±0.2

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

Table 8 - continued Biochemical findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
Male	Control	6	146.1 ±0.9	3.86 ±0.34	106.3 ±1.3
	1000mg/kg	6	145.7 ±0.9	4.14 ±0.16	104.9 ±0.8
Female	Control	6	145.8 ±0.9	4.36 ±0.25	110.2 ±1.0
	1000mg/kg	6	145.1 ±1.9	4.33 ±0.27	109.2 ±2.8

Values are mean±S.D.

Table 9 Necropsy findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Organs and findings	Sex Group and dose Number of animals	Male				Female			
		Control	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	Control	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
		6	6	6	6	6	6	6	6
Digestive system									
Tooth									
Loss, maxilla		0	0	0	1	0	0	0	0
Urinary system									
Kidney									
Mottle, grayish white, single		0	0	0	1	0	0	0	0
Dilatation, pelvic cavity, right		0	2	0	1	0	0	0	0
Genital system									
Testis						NA	NA	NA	NA
Atrophy, left		0	1	0	0				

NA: not applicable.

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 10 Necropsy findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

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

NR: no remarkable change.

Table 11 Organ weights in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose		Final Body Weight (g)	Brain		Heart		Lungs	
				(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)
Male	Control	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	365.5	2.08	0.57	1.32	0.36	1.37	0.38
		S.D.	±24.8	±0.06	±0.03	±0.17	±0.03	±0.09	±0.02
	250mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	361.7	2.11	0.59	1.43	0.39	1.28	0.35
		S.D.	±16.0	±0.09	±0.03	±0.11	±0.02	±0.02	±0.01
	500mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	367.4	2.09	0.57	1.41	0.38	1.30	0.36
		S.D.	±23.4	±0.05	±0.04	±0.20	±0.04	±0.04	±0.03
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	370.3	2.10	0.57	1.37	0.37	1.31	0.35
		S.D.	±14.9	±0.06	±0.03	±0.11	±0.02	±0.07	±0.02
Female	Control	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	220.7	1.91	0.87	0.94	0.42	1.03	0.47
		S.D.	±14.7	±0.07	±0.05	±0.07	±0.03	±0.11	±0.03
	250mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	210.9	1.88	0.89	0.80**	0.38**	0.99	0.47
		S.D.	±15.5	±0.09	±0.04	±0.08	±0.01	±0.08	±0.01
	500mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	220.1	1.90	0.87	0.86	0.39*	1.02	0.46
		S.D.	±12.5	±0.09	±0.07	±0.05	±0.02	±0.08	±0.02
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	218.8	1.94	0.89	0.84*	0.39*	1.00	0.46
		S.D.	±9.9	±0.04	±0.04	±0.05	±0.02	±0.09	±0.04

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

Table 11 - continued Organ weights in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose		Thymus		Liver		Spleen		Kidneys	
			(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)
Male	Control	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.49	0.14	11.15	3.04	0.72	0.20	2.68	0.74
		S.D.	±0.08	±0.02	±1.21	±0.16	±0.07	±0.02	±0.22	±0.09
	250mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.56	0.16	10.59	2.92	0.72	0.20	2.87	0.79
		S.D.	±0.06	±0.01	±0.80	±0.11	±0.15	±0.03	±0.34	±0.06
	500mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.50	0.14	11.08	3.01	0.78	0.21	2.83	0.77
		S.D.	±0.08	±0.02	±1.14	±0.14	±0.10	±0.02	±0.21	±0.07
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.57	0.15	10.94	2.95	0.65	0.18	2.77	0.75
		S.D.	±0.10	±0.03	±0.91	±0.16	±0.05	±0.01	±0.40	±0.09
Female	Control	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.50	0.22	6.58	2.97	0.50	0.23	1.60	0.73
		S.D.	±0.04	±0.02	±0.72	±0.13	±0.09	±0.02	±0.17	±0.04
	250mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.51	0.24	6.29	2.98	0.44	0.21	1.60	0.76
		S.D.	±0.07	±0.02	±0.77	±0.16	±0.06	±0.02	±0.19	±0.06
	500mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.55	0.25	6.66	3.03	0.54	0.24	1.65	0.75
		S.D.	±0.09	±0.03	±0.32	±0.08	±0.05	±0.02	±0.12	±0.05
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.55	0.25	6.74	3.08	0.50	0.23	1.72	0.79
		S.D.	±0.09	±0.03	±0.27	±0.09	±0.06	±0.02	±0.16	±0.06

Table 11 - continued Organ weights in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Sex	Group and dose		Adrenals		Testes		Ovaries	
			(mg)	(mg/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(mg)	(mg/100gB.W.)
Male	Control	N	6	6	6	6		
		Mean	65.0	17.8	3.25	0.89		
		S.D.	±6.0	±1.4	±0.09	±0.08		
	250mg/kg	N	6	6	6	6		
		Mean	61.3	17.0	3.08	0.85		
		S.D.	±4.7	±1.0	±0.30	±0.08		
	500mg/kg	N	6	6	6	6		
		Mean	63.1	17.2	3.25	0.89		
		S.D.	±6.6	±1.3	±0.23	±0.08		
	1000mg/kg	N	6	6	6	6		
		Mean	68.3	18.4	3.17	0.86		
		S.D.	±8.2	±2.1	±0.32	±0.10		
Female	Control	N	6	6			6	6
		Mean	69.7	31.6			87.6	39.8
		S.D.	±3.2	±1.6			±9.1	±4.5
	250mg/kg	N	6	6			6	6
		Mean	68.1	32.2			85.6	40.5
		S.D.	±6.9	±1.1			±10.8	±3.1
	500mg/kg	N	6	6			6	6
		Mean	67.5	30.7			86.2	39.1
		S.D.	±5.5	±2.3			±13.2	±5.0
	1000mg/kg	N	6	6			6	6
		Mean	69.4	31.7			88.5	40.6
		S.D.	±6.5	±2.3			±10.9	±6.2

Table 12 Organ weights in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose		Final Body Weight (g)	Brain		Heart		Lungs	
				(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)
Male	Control	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	408.2	2.08	0.51	1.41	0.35	1.28	0.32
		S.D.	±23.4	±0.07	±0.04	±0.10	±0.03	±0.06	±0.01
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	438.2	2.14	0.49	1.38	0.31*	1.38*	0.32
		S.D.	±36.3	±0.03	±0.04	±0.12	±0.02	±0.10	±0.03
Female	Control	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	234.8	1.93	0.83	0.82	0.35	1.00	0.43
		S.D.	±19.3	±0.06	±0.05	±0.08	±0.03	±0.06	±0.02
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	227.8	1.91	0.85	0.83	0.36	0.96	0.43
		S.D.	±23.8	±0.05	±0.08	±0.07	±0.01	±0.05	±0.03

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

Table 12 - continued Organ weights in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose		Thymus		Liver		Spleen		Kidneys	
			(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)
Male	Control	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.50	0.12	11.27	2.76	0.75	0.19	2.70	0.66
		S.D.	±0.06	±0.02	±1.20	±0.17	±0.06	±0.02	±0.23	±0.03
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.45	0.10	12.17	2.77	0.76	0.17	2.89	0.66
		S.D.	±0.13	±0.03	±1.45	±0.12	±0.11	±0.02	±0.30	±0.05
Female	Control	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.45	0.19	6.69	2.85	0.50	0.21	1.67	0.72
		S.D.	±0.07	±0.03	±0.60	±0.17	±0.07	±0.03	±0.06	±0.04
	1000mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.48	0.21	6.43	2.82	0.47	0.21	1.66	0.73
		S.D.	±0.14	±0.05	±0.83	±0.11	±0.04	±0.01	±0.10	±0.03

Table 12 - continued Organ weights in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose		Adrenals		Testes		Ovaries	
			(mg)	(mg/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(mg)	(mg/100gB.W.)
Male	Control	N	6	6	6	6		
		Mean	69.4	17.0	3.15	0.77		
		S.D.	±7.2	±1.7	±0.24	±0.07		
	1000mg/kg	N	6	6	6	6		
		Mean	70.1	16.0	3.40	0.78		
		S.D.	±10.6	±1.5	±0.22	±0.10		
Female	Control	N	6	6			6	6
		Mean	71.6	30.6			97.9	41.4
		S.D.	±3.3	±1.5			±23.1	±6.8
	1000mg/kg	N	6	6			6	6
		Mean	70.1	30.8			82.8	36.0
		S.D.	±7.1	±1.5			±18.9	±4.5

Table 13 Histopathological findings in rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid for 28 days

Organs and findings	Sex Group and dose Number of animals	Male				Female											
		Control	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	Control	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg								
		6				6											
		-	+	*	**	-	+	*	**	-	+	*	**				
Urinary system																	
Kidney		(6)				(2)				(0)							
Change, basophilic, proximal tubules		6	0	0	0	2	0	0	0	5	1	0	0	6	0	0	0
Dilatation, distal tubules		6	0	0	0	2	0	0	0	5	1	0	0	6	0	0	0
Calcification, papilla		6	0	0	0	2	0	0	0	5	1	0	0	6	0	0	0
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitial		6	0	0	0	2	0	0	0	5	1	0	0	6	0	0	0
Dilatation, pelvic cavity		6	0	0	0	0	2	0	0	5	1	0	0	6	0	0	0
Genital system																	
Testis		(0)				(1)				(0)							
Atrophy						0	1	0	0					NA	NA	NA	NA

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

NA: not applicable.

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

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