

最 終 報 告 書

アゾイック CC-2 のラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験
(試験番号 : 06-108)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

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) 一般状態観察	4
2) 機能観察総合検査	4
3) 体重および摂餌量	5
4) 尿検査	5
5) 血液学検査	5
6) 血液生化学検査	6
7) 剖検および器官重量	6
8) 病理組織学検査	6
5. 統計解析	7
結果	9
1. 一般状態および死亡	9
2. 機能観察総合検査	9
3. 体重	9
4. 摂餌量	9
5. 尿検査	9
6. 血液学検査	10
9. 血液生化学検査	10
8. 剖検	10
9. 器官重量	10
10. 病理組織学検査	10
考察	12

文献	14
----	-------	----

添付資料

A 図・群別平均値表

Figures 1, 2	体重	1
Tables 1, 2	一般状態および死亡率	3
Tables 3, 4	詳細な臨床観察	5
Tables 5, 6	感覚反射機能検査	19
Tables 7, 8	握力および自発運動量	23
Tables 9, 10	体重	27
Tables 11, 12	摂餌量	29
Tables 13, 14	尿検査	31
Tables 15, 16	血液学検査	35
Tables 17, 18	血液生化学検査	39
Tables 19, 20	剖検	43
Tables 21, 22	器官重量	45
Tables 23, 24	病理組織学検査	49

要 約

アゾイック CC-2 を 1 群雌雄各 5 匹の SD 系ラットに、0, 60, 250 および 1000 mg/kg/day の用量で 28 日間経口投与し、その反復投与毒性について検討した。現れる変化の可逆性を調べるため、0 および 1000 mg/kg/day では、投与終了後 14 日間の回復期間を設けたサテライト群を別に設けた。

一般状態の観察、詳細な臨床観察、感覚機能検査、握力、自発運動量、体重および摂餌量の測定、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、剖検、器官重量の測定並びに病理組織学検査において、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

回復期間中および回復期間終了時の検査で、雌に体重および摂餌量の低値が認められた。当該群の肺、心臓、肝臓、腎臓および脾臓の病理組織学検査では、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、アゾイック CC-2 のラットへの 28 日間反復経口投与において、毒性影響は認められなかった。無影響量 (NOEL) および無毒性量 (NOAEL) は、雌雄とも 1000 mg/kg/day と結論された。

目的

アゾイック CC-2 をラットに 28 日間経口投与し、本物質の反復投与毒性について検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質として用いたアゾイック CC-2 (CAS 番号 92-77-3) は、水および油に難溶で、常温では極薄い黄色の粉末である。試験には、

試薬として (純度 101.2 %) を入手して、冷暗所 (2~6°C)，密封下で保管し、使用した。保管した被験物質は投与終了後に、東京化成工業株式会社において分析（中和滴定法）し、安定であったことを確認した。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。

被験物質は、1 w/v%メチルセルロース水溶液（メチルセルロース 100cP；和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWK3873 および局方精製水；共栄製薬株式会社、ロット番号 181583）を用いて、所定の投与用量になる濃度に懸濁し、投与液とした。被験物質調製液の安定性を調べた結果、7 日間保管しても安定性があることが確認された (Appendix 2) ので、投与液は、週 1 回調製して 1 日の使用量に小分けし、使用時まで冷所 (2~6°C)・遮光下で保管した。さらに、投与液の濃度確認として、初回に調製したそれぞれ 1.2, 5 および 20 w/v% 液について分析 (HPLC) 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 [Crl : CD(SD)] ラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバース株式会社 厚木飼育センター（神奈川県厚木市下古沢 795）から 4 週齢のものを搬入（雌雄各 36 匹）し、雄で 7 日間、雌で 8 日間試験環境に馴化させ、その間に検疫を行い、発育が順調で、一般健康状態が良好な雌雄各 30 匹を、5 週齢で試験に用いた。

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 4 室）で、個体別にステンレス製金網ケージ [260W × 380D ×

180 H(mm)] に収容し、これをステンレス製 5 段のラックに配置して飼育した。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 061272, 20070470)および飲料水(孔径 1 μm 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により、自由に摂取させた。

動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付並びに耳パンチ法により行った。

飼育期間中、動物室の温度は 22.1~23.9°C、湿度は 53~61% の範囲で推移(Appendix 4) し、また、飼料中の汚染物質の分析結果は、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にあり(Appendix 5)，飲料水は水道法に基づく水質基準に適合する(Appendix 6) ことを確認した。従って、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。

本試験は、動物実験を科学的観点および倫理的な配慮の下に実施するために遵守すべき事項などを定めた、「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、本施設の動物実験委員会の承認を得て行った。

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、1群雌雄各 4 匹の SD 系 [Crl : CD(SD)] ラットに、アゾイック CC-2 を 0 (溶媒対照、1 w/v% メチルセルロース水溶液), 30, 100, 300 および 1000 mg/kg/day の用量で 14 日間経口投与した。その結果、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、剖検並びに器官重量の測定で、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、28 日間反復投与する本試験での投与量は、最高用量を試験法ガイドラインで規定されている上限量の 1000 mg/kg/day とし、以下 250 および 60mg/kg/day の計 3 用量を設定した。これら投与終了時に屠殺する群とは別に、現れる毒性変化の可逆性を調べるため、対照と 1000 mg/kg/day の群には投与終了 14 日後に屠殺するサテライト群を設けた。

試験群の構成は、①媒体投与群(以下、対照群)、②回復群の対照群、③被験物質の 60 mg/kg/day 投与群(60 mg/kg 群)、④同 250 mg/kg/day 投与群(250 mg/kg 群)、⑤

同 1000 mg/kg/day 投与群 (1000 mg/kg 群) および⑥同 1000 mg/kg/day 投与群の回復群 (回復群) の 6 群で、各群の動物数は雌雄各 5 匹とした。

動物の群分けは、投与開始前日に行った。健常と判断された動物について、雌雄それぞれ全動物の体重の平均値に近いものから必要数を選別し、体重により層別化した後、動物を無作為に各群に振り分け、各群の体重分布が均一となるようにした。投与開始時の体重の平均値(体重範囲)は、雄 156(148～162)g、雌 143(135～152)g であった。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5mL 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、1 日 1 回 (午前中 9:00～10:42)、28 日間にわたって経口投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。対照群には、媒体として用いた 1 w/v% メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

4. 観察および検査

観察期間は、投与開始前日から投与期間の 28 日間およびサテライト群ではそれに続く回復期間の 14 日間とし、次の観察および検査を実施した。

1)一般状態観察

全例について、毎日、投与期間においては投与前、投与直後、投与後概ね 30 分～1 時間および 4 時間以降の 4 回、回復期間においては少なくとも 1 回、動物の生死、外観、行動などについて観察した。

2)機能観察総合検査

(1) 詳細な臨床観察

サテライト群も含めて、投与開始前日およびその後は週 1 回、ケージサイドでの観察に加えて、ケージから出す時およびケージ外のアルミ製オープンフィールド (370W × 560D × 40Hmm) で、ケージからの出し易さ、ケージから出す時の扱い易さ、発声、体躯緊張 (弛緩～強直)、皮膚 (色)、毛並み、下腹部被毛の尿による汚れ、肛門周囲の便による汚れ、眼瞼閉鎖状態、眼球突出、眼・鼻の分泌物、流涙、流涎、立毛、呼吸、歩行 (よろめき)、姿勢、探索行動 (覚醒度)、振戦、痙攣、異常行動 (自咬、後ろ向き歩行等)、常同行動 (過度の毛繕い、反復旋回運動等)、排尿 (回数) および排糞 (個数) について観察し、認められた変化を評点 (Appendix 7) で記録した。動物には無作為化法で観察番号を付け、観察者以外の者が群や動物番号を表示したケージの標識札を観

察番号のみ表示した標識札に替え、観察者は観察番号順に観察を行うことにより、投与内容が不明な状態で観察した。

(2) 感覚機能検査

投与 4 週およびサテライト群については回復 2 週に、視覚反応（顔面に棒を近づけた場合の接近反応）、聴覚反応（ピンセットで軽くケージを叩く音に対する反応）、触覚反応（腰部に触れた場合の反応）、痛覚反応（尾根部をピンセットで摘んだ場合の逃避、発声などの反応）、瞳孔反射（光に対する瞳孔の反応）および正向反射（面上で動物を背臥位にした場合の正常姿勢にもどる反応）を調べ、認められた反応を評点（Appendix 8）で記録した。

(3) 握力および自発運動量

投与 4 週およびサテライト群については回復 2 週に、自発運動量（自発運動量測定装置、SUPERMEX、室町機械株式会社、動物が発する遠赤外線をセンサーが感知し、測定装置内の区画間の 60 分間における移動回数を測定）並びに前肢および後肢の握力（ラット・マウス用握力測定装置、MK-380R/FR、室町機械株式会社）を測定した。

3) 体重および摂餌量

体重は、投与 1（投与開始直前）、7、14、21 および 28 日、回復 7 日および 14 日並びに屠殺日に測定し、投与期間中の体重増加量を算出した。摂餌量は、毎週 1 回、雄は投与 5、12、19 および 26 日並びに回復 5 および 12 日、雌は投与 4、11、18 および 25 日並びに回復 4 および 11 日に、翌日までの 24 時間の摂餌量（飼料消費量）を測定した。

体重および摂餌量測定の測定には、電子天秤（FY-3000、エー・アンド・ディ株式会社）を用いた。

4) 尿検査

投与 4 週およびサテライト群ではさらに回復 2 週に、腰部を刺激して新鮮尿を採取し、色調および濁度の観察並びに試験紙法（マルティスティックス、バイエルメディカル株式会社）による pH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンの定性的検査を行った。

5) 血液学検査

投与期間および回復期間終了の翌日に、エーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より採血

した。動物は前日の午後 5 時より除餌し、水のみを給与した。採取した血液は 3 分割し、その一部は EDTA・2K で凝固阻止処理し、多項目自動血球計数装置（XT-2000iV、システムズ株式会社）により、赤血球数（電気抵抗検出法）、血色素量（ラウリル硫酸ナトリウム・ヘモグロビン法）、ヘマトクリット値（赤血球パルス高値検出法）、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度（以上、計算値）、血小板数（電気抵抗検出法）、白血球数、網状赤血球数および白血球百分率（以上、フローサイトメトリー法）を測定した。また、血液の一部を 3.8 % クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を遠心分離し、血液凝固自動測定装置（KC-10A、米国アーベント社）により、プロトロンビン時間（Quick 一段法）および活性化部分トロンボプラスチン時間（エラジン酸活性化法）を測定した。

6) 血液生化学検査

採取した血液の一部から血清を遠心分離し、生化学自動分析装置（JCA-BM8 型クリナライザー、日本電子株式会社）により、総タンパク（ビューレット法）、アルブミン（BCG 法）、A/G 比（計算値）、血糖[酵素法（GluK¹⁾・G-6-PDH²⁾・UV 系】、総コレステロール【（酵素法（CES³⁾・CO⁴⁾・POD⁵⁾ 系】、トリグリセライド[酵素法（LPL⁶⁾・GK⁷⁾・GPO⁸⁾・POD⁵⁾ 系】、総ビリルビン（ジアゾ法）、尿素窒素（ウレアーゼ・UV 法）、クレアチニン（Jaffe 法）、AST、ALT、ALP（以上、JSCC⁹⁾ 法）、γ-GTP（SSCC 法¹⁰⁾）、LDH（SFBC¹¹⁾ 法）、カルシウム（OCPC 法）および無機リン[酵素法（PNP¹²⁾・XOD¹³⁾・POD⁵⁾ 系】を、また電解質自動分析装置（NAKL-132、東亜電波工業株式会社）により、ナトリウム、カリウムおよび塩素（以上、イオン電極法）を測定した。

測定法の注釈； ①：グルコキナーゼ、②：グルコース・6-リン酸脱水素酵素、③：コレステロールエステラーゼ、④：コレステロールオキシダーゼ、⑤：ペルオキシダーゼ、⑥：リポプロテインリバーゼ、⑦：グリセロールキナーゼ、⑧：L-α-グリセロリン酸オキシダーゼ、⑨：日本臨床化学会、⑩：スカンジナビア臨床化学会、⑪：フランス臨床生物学会、⑫：プリンヌクレオンドホスフォリラーゼ、⑬：キサンチンオキシダーゼ

7) 割検および器官重量

所定の投与期間および回復期間終了翌日の採血に続いて放血屠殺し、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、脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓さらに雄では精巣、精巣上体、雌では卵巣（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、下垂体および甲状腺は固定後に秤量した。

8)病理組織学検査

全例について下記器官を採取し、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。

脳（大脳、小脳、橋を含む）、眼球、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、脊髄（頸部、胸部、腰部）、心臓、気管、肺（固定液を注入後浸漬）、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、腸（十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、ペイエル板を含む）、生殖器（精巣又は卵巣）、副生殖器（子宮、腫又は前立腺、精巣上体、精嚢）、膀胱、坐骨神経、リンパ節（下顎リンパ節、腸間膜リンパ節）、骨髄（大腿骨）、その他肉眼的異常部位。

病理組織学検査は、対照群および1000 mg/kg群の上記保存器官について実施した。その結果、被験物質の投与に起因する変化が認められなかつたので、60および250 mg/kg群については検査を実施しなかつた。回復群については、雌で体重、血液生化学検査および器官重量において変化が認められたため、関連する可能性が考えられた雌の肺、心臓、肝臓、腎臓および脾臓を検査した。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。

5. 統計解析

パラメトリックデータ（握力・自発運動量・体重・体重増加量・摂餌量・血液学検査データ・血液生化学検査データ・器官重量）については、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群が3群以上の場合は、Bartlettの分散検定を行い、その結果分散が一様な場合は一元配置の分散分析を行った。分散が一様でない場合並びにノンパラメトリックデータ（白血球百分率・尿検査データ）は Kruskal-Wallis の順位検定を行った。それらの結果有意差を認めた場合、Dunnettないし Dunnett型の検定法により対照群に対する比較検定を行った。試験群が2群の場合は、パラメトリックデータについてF検定を行い、その結果分散が一様な場合は Student のt検定を、一様でない場合は Aspin-Welch のt検定を行った。また、ノンパラメトリックデータは、Mann-Whitney のU検定を行った。カテゴリカルデータ（一般状態の観察・詳細な臨床観察・感覚機能検査・剖検・病理組織学検査における異常例の発現率）には Fisher

の直接確率法を用いた。有意水準は、いずれの検定法も 5%とした。

結 果

1. 一般状態および死亡 (Tables 1, 2, Appendices 9, 10)

投与期間および回復期間を通じて、一般状態の変化および死亡は認められなかった。

2. 機能観察総合検査

1) 詳細な臨床観察 (Tables 3, 4, Appendices 11, 12)

投与期間中および回復期間中の検査において、各観察項目に有意な変化は認められなかつた。

2) 感覚機能検査 (Tables 5, 6, Appendices 13, 14)

投与期間中および回復期間中の検査において、各検査項目に有意な変化は認められなかつた。

3) 握力および自発運動量 (Tables 7, 8, Appendices 15, 16)

投与期間中および回復期間中の検査において、前肢および後肢の握力並びに自発運動量に有意な変化は認められなかつた。

3. 体重 (Figures 1, 2, Tables 9, 10, Appendices 17, 18)

投与期間において、各測定時点の体重および投与期間中の体重増加量に、有意な変化は認められなかつた。

回復期間において、回復群の雌で回復 7 日および 14 日の体重並びに回復期間中の体重増加量に有意な低値が認められた。

4. 摂餌量 (Tables 11, 12, Appendices 19, 20)

投与期間において、各測定時の摂餌量測定に、有意な変化は認められなかつた。

回復期間において、回復群の雌で回復 1 週の摂餌量に有意な低値が認められた。

5. 尿検査 (Tables 13, 14, Appendices 21, 22)

投与期間中および回復期間中の検査において、各検査項目に有意な変化は認められなかつた。

6. 血液学検査 (Tables 15, 16, Appendices 23, 24, 背景データ Appendices 31, 32)

投与期間終了時および回復期間終了時の検査において、各検査項目に有意な変化は認められなかつた。

7. 血液生化学検査 (Tables 17, 18, Appendices 25, 26, 背景データ Appendices 31, 32)

投与期間終了時の検査において、60 および 1000 mg/kg 群で雄にクレアチニン濃度の有意な低値が認められた。しかしながら、変化に用量相関性は認められなかつた。

回復期間終了時の検査においては、回復群の雌に LDH 活性および ALT 活性の有意な高値が認められた。

8. 剖検 (Tables 19, 20, Appendices 27, 28)

被験物質の投与に起因する変化は認められなかつた。

被験物質の投与とは無関係に、投与期間終了時屠殺動物で、対照群および 60 mg/kg 群の雄の各 1 匹に胸腺の赤色域が、また回復期間終了時屠殺動物で、対照群の雄の 1 匹に精巣の小型化（左側）が認められた。

11. 器官重量 (Tables 21, 22, Appendices 29, 30)

投与期間終了時屠殺動物において、60 および 1000 mg/kg 群で雄に精巣の絶対重量における有意な高値、1000 mg/kg 群で雌に脳の絶対重量における有意な高値および下垂体の相対重量における有意な低値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、回復群の雌に、腎臓の相対重量における有意な高値がみられた。

12. 病理組織学検査 (Tables 23, 24, Appendices 27, 28)

被験物質の投与に起因する変化は認められなかつた。

なお、投与期間終了時屠殺動物および回復期間終了時屠殺動物の対照群にのみ、ある

いは対照群と 1000mg/kg 群に共通して、肺の泡沫細胞集簇巣および動脈壁鉄質沈着、肝臓の巣状壊死、微小肉芽腫および彌慢性肝細胞脂肪変性、腺胃の胃底腺拡張、腎臓の好塩基性尿細管、リンパ球皮質浸潤、孤立性囊胞および尿細管拡張、甲状腺の鰓囊遺残、精巣の精細管委縮（片側性）および前立腺の間質リンパ球浸潤がいずれも低い発現率で認められた。また、雄の腎臓の近位尿細管上皮硝子滴並びに雌雄の脾臓の髓外造血および褐色色素沈着がいずれも高い発現率で認められた。しかしながら、1000 mg/kg 群の発現率や変化の程度に対照群と差は認められなかった。投与期間終了時屠殺動物において、1000 mg/kg 群にのみ発現した変化は認められなかった。回復期間終了時屠殺動物においては、雌の肺、心臓、肝臓、腎臓および脾臓を検査したが、被験物質の投与と関連する変化は認められなかった。回復群にのみ、雌の腎臓に皮質線維化巣（片側性）および腎孟拡張（片側性）が認められたが、これらは片側性、かつラットに背景病変として認められる変化¹⁾であることから、被験物質の投与とは無関係な自然発生病変と判断された。

考 察

アゾイック CC-2 をラットに 0, 60, 250 および 1000 mg/kg/day の用量で 28 日間経口投与し、本物質の反復投与毒性について検討した。

その結果、一般状態の観察、機能観察総合検査、体重、摂餌量、尿検査、血液学検査、剖検および病理組織学検査において、被験物質の投与による変化は認められなかった。

また、血液生化学検査で認められた 60 および 1000 mg/kg 群の雄のクレアチニン濃度の低値については、変化に用量相関性は認められず、各個体値は背景データにおける基準値の範囲内の変動（Appendix 31 参照）で、しかも毒性学的意義のない減少性の変化であった。

さらに、器官重量で認められた 60 および 1000 mg/kg 群の雄の精巣並びに 1000 mg/kg 群の雌の脳のいずれも絶対重量のみの高値や、1000 mg/kg 群の雌の下垂体の相対重量のみの低値についても、病理組織学検査で当該器官に被験物質の投与に起因する変化は認められず、ほかに関連する変化も認められなかった。

従って、これらの投与期間終了時屠殺動物で認められた変化はいずれも、被験物質の毒性影響を示すものではなく、偶発的変化と判断された。

回復期間終了時屠殺動物においては、回復群で雌に回復 1 週の摂餌量、回復 7 および 14 日の体重並びに回復期間中体重増加量の低値が認められた。さらに、回復群の雌に、血清 LDH 活性および ALT 活性並びに腎臓相対重量の高値が認められた。

これらが、被験物質の遅発的毒性を示す変化であるかを検討するため、回復群の雌について主要器官（肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓）の病理組織学検査を実施したが、被験物質の投与と関連する変化は認められなかった。

回復群の雌の腎臓においては、自然発生病変と判断された皮質線維化巣（片側性）および腎孟拡張（片側性）が認められ、これらの偶発病変が腎臓相対重量の高値をもたらした可能性が考えられる。

また、肝臓や心臓に血清 LDH 活性および ALT 活性の高値と関連する変化は認められず、また各個体のこれら活性値はいずれも、背景データにおける基準値の範囲内の値（Appendix 32 参照）であった。

これら検討においても、回復群の雌の摂餌量および体重の低値について、被験物質の投与との関連性を明確にすることはできなかったが、被験物質の遅延毒性として発現し

た可能性は低いものと判断した。

以上の結果から、アゾイック CC-2 のラットへの 28 日間反復経口投与において、毒性影響は認められなかった。無影響量 (NOEL) および無毒性量 (NOAEL) は、雌雄とも 1000 mg/kg/day と結論された。

文 献

- 1) 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)

アゾイックCC-2のラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

(試験番号 : 06-108)

最終報告書 添付資料A

(図・群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

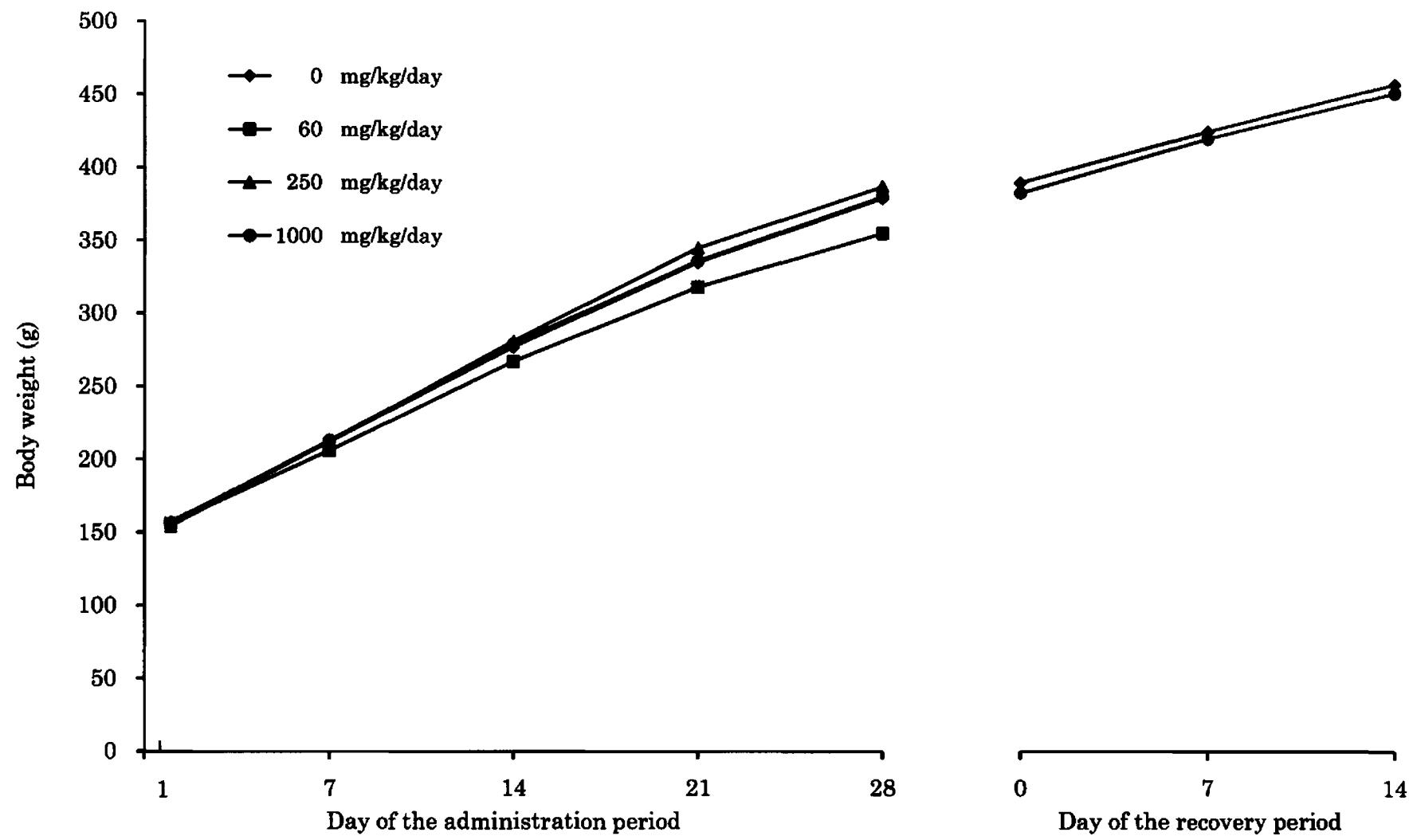


Fig.1 Body weight change of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

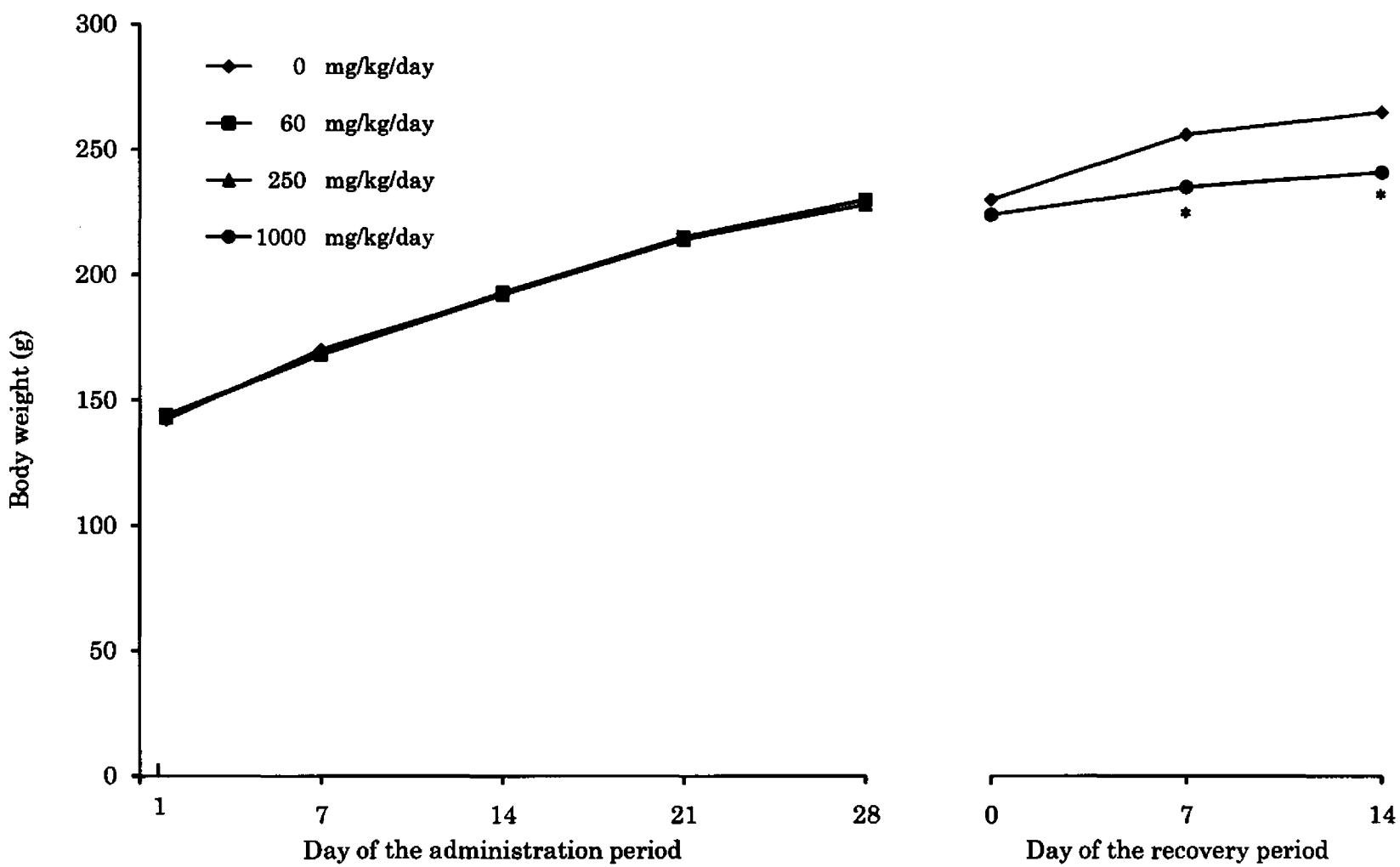


Fig.1 Body weight change of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 1 General conditions and mortality of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

General conditions (Clinical signs)	Dose (mg/kg/day)	Administration period								Recovery period		
		0			60		250			1000		
		KA	KR	Total	KA	KA	KA	KR	Total	KR	KR	
	No. of animals	5	5	10	5	5	5	5	10	5	5	
Abnormalities detected		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mortality (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

KA : Killed by design at the end of administration period.

KR : Killed by design at the end of recovery period.

Table 2 General conditions and mortality of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

General conditions (Clinical signs)	Dose (mg/kg/day) Fate	Administration period								Recovery period		
		0			60		250			1000		
		KA	KR	Total	KA	KA	KA	KR	Total	KR	KR	
No. of animals		5	5	10	5	5	5	5	10	5	5	
Abnormalities detected		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mortality (%)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

KA : Killed by design at the end of administration period.

KR : Killed by design at the end of recovery period.

Table 3-1 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(Before the administration period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	4	4	10
	2 or more		0	1	1	0
Defecation	Color: Pale yellow	2/2	2/2	2/2	2/2	
	Not detected or 1	8	5	5	10	
	2 or more	2	0	0	0	
	Appearance:Normal	3/3	-	-	-	

Table 3-2 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 1 of the administration period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	4	8
	2 or more		0	0	1	2
	Color: Pale yellow	5/5	1/1	2/2	4/4	
Defecation	Not detected or 1		8	5	5	8
	2 or more		2	0	0	2
	Appearance: Normal	2/2	-	1/1	2/2	

Table 3-3 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 2 of the administration period)

Items	Dose (mg/kg/day)	No. of animals			
		0 10	60 5	250 5	1000 10
Reactivity on removal from the cage	Normal	10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal	10	5	5	10
Muscle tone	Normal	10	5	5	10
Skin	Normal	10	5	5	10
Fur	Normal	10	5	5	10
Piloerection	Not detected	10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected	10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected	10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected	10	5	5	10
Lacrimation	Not detected	10	5	5	10
Salivation	Not detected	10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected	10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected	10	5	5	10
Vocalization	Not detected	10	5	5	10
Breathing	Normal	10	5	5	10
Body position	Normal	10	5	5	10
Convulsion	Not detected	10	5	5	10
Tremor	Not detected	10	5	5	10
Exploration	Normal	10	5	5	10
Walk	Normal	10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected	10	5	5	10
Stereotypy	Not detected	10	5	5	10
Urination	Not detected or 1	10	5	5	10
	2 or more	0	0	0	0
	Color: Pale yellow	1/1	1/1	-	2/2
Defecation	Not detected or 1	9	5	5	10
	2 or more	1	0	0	0
	Appearance:Normal	2/2	-	-	-

Table 3-4 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 3 of the administration period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	4	9
	2 or more		0	0	1	1
	Color: Pale yellow		1/1	-	1/1	4/4
Defecation	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Appearance:Normal		-	-	-	-

Table 3-5 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

⟨ On week 4 of the administration period ⟩

Items		Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Color: Pale yellow		4/4	-	1/1	3/3
Defecation	Not detected or 1		9	4	4	10
	2 or more		1	1	1	0
	Appearance:Normal		1/1	1/1	1/1	1/1

Table 3-6 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 1 of the recovery period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	1000
		No. of animals	5	5
Reactivity on removal from the cage	Normal		5	5
Reactivity on handling	Normal		5	5
Muscle tone	Normal		5	5
Skin	Normal		5	5
Fur	Normal		5	5
Piloerection	Not detected		5	5
Eye-nose discharge	Not detected		5	5
Palpebral closure	Not detected		5	5
Exophthalmos	Not detected		5	5
Lacrimation	Not detected		5	5
Salivation	Not detected		5	5
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		5	5
Blotted fur around anus with feces	Not detected		5	5
Vocalization	Not detected		5	5
Breathing	Normal		5	5
Body position	Normal		5	5
Convulsion	Not detected		5	5
Tremor	Not detected		5	5
Exploration	Normal		5	5
Walk	Normal		5	5
Abnormal behavior	Not detected		5	5
Stereotypy	Not detected		5	5
Urination	Not detected or 1		5	5
	2 or more		0	0
	Color: Pale yellow		-	1/1
Defecation	Not detected or 1		5	5
	2 or more		0	0
	Appearance: Normal		-	-

Table 3-7 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 2 of the recovery period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	1000
		No. of animals	5	5
Reactivity on removal from the cage	Normal		5	5
Reactivity on handling	Normal		5	5
Muscle tone	Normal		5	5
Skin	Normal		5	5
Fur	Normal		5	5
Piloerection	Not detected		5	5
Eye-nose discharge	Not detected		5	5
Palpebral closure	Not detected		5	5
Exophthalmos	Not detected		5	5
Lacrimation	Not detected		5	5
Salivation	Not detected		5	5
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		5	5
Blotted fur around anus with feces	Not detected		5	5
Vocalization	Not detected		5	5
Breathing	Normal		5	5
Body position	Normal		5	5
Convulsion	Not detected		5	5
Tremor	Not detected		5	5
Exploration	Normal		5	5
Walk	Normal		5	5
Abnormal behavior	Not detected		5	5
Stereotypy	Not detected		5	5
Urination	Not detected or 1		5	4
	2 or more		0	1
	Color: Pale yellow		2/2	1/1
Defecation	Not detected or 1		3	5
	2 or more		2	0
	Appearance:Normal		2/2	-

Table 4-1 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(Before the administration period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		9	5	4	10
	2 or more		1	0	1	0
	Color: Pale yellow		5/5	3/3	1/1	7/7
Defecation	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Appearance: Normal		1/1	-	-	1/1

Table 4-2 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 1 of the administration period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	4	9
	2 or more		0	0	1	1
	Color: Pale yellow		2/2	-	2/2	3/3
Defecation	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Appearance: Normal		1/1	-	-	-

Table 4-3 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 2 of the administration period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Color: Pale yellow		2/2	-	1/1	-
Defecation	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Appearance:Normal		-	-	-	-

Table 4-4 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

⟨ On week 3 of the administration period ⟩

Items		Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Color: Pale yellow		1/1	-	-	1/1
Defecation	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Appearance: Normal		-	-	-	-

Table 4-5 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 4 of the administration period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacration	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Color: Pale yellow		3/3	1/1	-	-
Defecation	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Appearance:Normal		-	-	-	-

Table 4-6 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 1 of the recovery period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	1000
		No. of animals	5	5
Reactivity on removal from the cage	Normal		5	5
Reactivity on handling	Normal		5	5
Muscle tone	Normal		5	5
Skin	Normal		5	5
Fur	Normal		5	5
Piloerection	Not detected		5	5
Eye-nose discharge	Not detected		5	5
Palpebral closure	Not detected		5	5
Exophthalmos	Not detected		5	5
Lacrimation	Not detected		5	5
Salivation	Not detected		5	5
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		5	5
Blotted fur around anus with feces	Not detected		5	5
Vocalization	Not detected		5	5
Breathing	Normal		5	5
Body position	Normal		5	5
Convulsion	Not detected		5	5
Tremor	Not detected		5	5
Exploration	Normal		5	5
Walk	Normal		5	5
Abnormal behavior	Not detected		5	5
Stereotypy	Not detected		5	5
Urination	Not detected or 1 2 or more Color: Pale yellow		5 0 -	5 0 -
Defecation	Not detected or 1 2 or more Appearance:Normal		5 0 -	5 0 -

Table 4-7 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 2 of the recovery period)

Items		Dose (mg/kg/day)	0	1000
		No. of animals	5	5
Reactivity on removal from the cage	Normal		5	5
Reactivity on handling	Normal		5	5
Muscle tone	Normal		5	5
Skin	Normal		5	5
Fur	Normal		5	5
Piloerection	Not detected		5	5
Eye-nose discharge	Not detected		5	5
Palpebral closure	Not detected		5	5
Exophthalmos	Not detected		5	5
Lacrimation	Not detected		5	5
Salivation	Not detected		5	5
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		5	5
Blotted fur around anus with feces	Not detected		5	5
Vocalization	Not detected		5	5
Breathing	Normal		5	5
Body position	Normal		5	5
Convulsion	Not detected		5	5
Tremor	Not detected		5	5
Exploration	Normal		5	5
Walk	Normal		5	5
Abnormal behavior	Not detected		5	5
Stereotypy	Not detected		5	5
Urination	Not detected or 1		4	5
	2 or more		1	0
	Color: Pale yellow		2/2	1/1
Defecation	Not detected or 1		5	5
	2 or more		0	0
	Appearance: Normal		-	-

Table 5-1 Incidence of responses in the sensory/reflex function test of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Items	Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
	No. of animals examined	5	5	5	5
Eye sight reaction	Normal	5	5	5	5
Hearing reaction	Normal	5	5	5	5
Sense of touch reaction	Normal	5	5	5	5
Pain reaction	Normal	5	5	5	5
Pupil reflex	Normal	5	5	5	5
Righting reflex	Normal	5	5	5	5

Table 5-2 Incidence of responses in the sensory/reflex function test of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >

Items	Dose (mg/kg/day)	0	1000
	No. of animals examined	5	5
Hearing reaction	Normal	5	5
Eye sight reaction	Normal	5	5
Sense of touch reaction	Normal	5	5
Pain reaction	Normal	5	5
Pupil reflex	Normal	5	5
Righting reflex	Normal	5	5

Table 6-1 Incidence of responses in the sensory/reflex function test of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Items	Dose (mg/kg/day)	0	60	250	1000
	No. of animals examined	5	5	5	5
Eye sight reaction	Normal	5	5	5	5
Hearing reaction	Normal	5	5	5	5
Sense of touch reaction	Normal	5	5	5	5
Pain reaction	Normal	5	5	5	5
Pupil reflex	Normal	5	5	5	5
Righting reflex	Normal	5	5	5	5

Table 6-2 Incidence of responses in the sensory/reflex function test of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >

Items	Dose (mg/kg/day)	0	1000
	No. of animals examined	5	5
Eye sight reaction	Normal	5	5
Hearing reaction	Normal	5	5
Sense of touch reaction	Normal	5	5
Pain reaction	Normal	5	5
Pupil reflex	Normal	5	5
Righting reflex	Normal	5	5

Table 7-1 Grip strength and motor activity of male rats treated with
C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Grip strength (g)		Motor activity (counts)	
		Forelimb	Hindlimb	0~60min.	
0	5	700 ± 55	361 ± 97	12270 ± 2793	
60	5	633 ± 73	401 ± 57	13196 ± 3130	
250	5	608 ± 72	306 ± 48	14310 ± 2179	
1000	5	731 ± 79	383 ± 59	13181 ± 2617	

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 7.2 Grip strength and motor activity of male rats treated with
C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Grip strength (g)		Motor activity (counts) 0~60min.
		Forelimb	Hindlimb	
0	5	700 ± 225	340 ± 87	15324 ± 1934
1000	5	556 ± 55	308 ± 85	13792 ± 1565

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 8-1 Grip strength and motor activity of female rats treated with
C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Grip strength (g)		Motor activity (counts) 0~60min.
		Forelimb	Hindlimb	
0	5	504 ± 85	404 ± 99	15291 ± 2632
60	5	589 ± 103	438 ± 82	16014 ± 1448
250	5	489 ± 100	389 ± 57	15297 ± 1776
1000	5	511 ± 62	413 ± 46	14649 ± 2302

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 8-2 Grip strength and motor activity of female rats treated with
C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Grip strength (g)		Motor activity (counts) 0~60min.
		Forelimb	Hindlimb	
0	5	620 ± 37	379 ± 33	14611 ± 3578
1000	5	557 ± 72	399 ± 32	16328 ± 3008

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 9 Body weight of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(g)

Dose (mg/kg/day)	Day of the administration period					Day of the recovery period					
						Gain				Gain	
	1	7	14	21	28	1~28	0	7	14	0~14	
0	157 ± 3 (10)	212 ± 9 (10)	277 ± 15 (10)	335 ± 18 (10)	379 ± 26 (10)	223 ± 23 (10)	389 ± 5 (5)	424 ± 4 (5)	456 ± 10 (5)	66 ± 7 (5)	
60	156 ± 4 (5)	206 ± 7 (5)	267 ± 14 (5)	318 ± 26 (5)	355 ± 39 (5)	200 ± 40 (5)					
250	154 ± 5 (5)	212 ± 12 (5)	281 ± 15 (5)	345 ± 20 (5)	387 ± 25 (5)	233 ± 24 (5)					
1000	156 ± 3 (10)	213 ± 8 (10)	279 ± 15 (10)	336 ± 27 (10)	380 ± 35 (10)	224 ± 35 (10)	382 ± 37 (5)	419 ± 48 (5)	450 ± 53 (5)	68 ± 16 (5)	

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals.

Table 10 Body weight of female rats treated with C.I. azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(g)

Dose (mg/kg/day)	Day of the administration period						Day of the recovery period			
				Gain		1~28				Gain
	1	7	14	21	28		0	7	14	
0	142	170	192	214	228	87	230	256	265	35
	± 4 (10)	± 9 (10)	± 14 (10)	± 14 (10)	± 18 (10)	± 15 (10)	± 14 (5)	± 11 (5)	± 14 (5)	± 6 (5)
60	144	168	193	215	230	86				
	± 7 (5)	± 12 (5)	± 15 (5)	± 19 (5)	± 22 (5)	± 18 (5)				
250	143	168	192	214	228	85				
	± 6 (5)	± 8 (5)	± 18 (5)	± 20 (5)	± 19 (5)	± 17 (5)				
1000	143	168	193	215	230	87	224	235 *	241 *	17 **
	± 5 (10)	± 8 (10)	± 11 (10)	± 14 (10)	± 15 (10)	± 15 (10)	± 16 (5)	± 16 (5)	± 18 (5)	± 5 (5)

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

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

Table 11 Food consumption of male rats treated with C. I. azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Dose (mg/kg/day)	(g/rat/day)					
	Week of the administration period				Week of the recovery period	
	1	2	3	4	1	2
0	29 ± 1 (10)	33 ± 2 (10)	35 ± 3 (10)	36 ± 3 (10)	36 ± 2 (5)	36 ± 4 (5)
60	28 ± 3 (5)	32 ± 3 (5)	33 ± 3 (5)	32 ± 5 (5)		
250	28 ± 3 (5)	34 ± 2 (5)	34 ± 2 (5)	37 ± 3 (5)		
1000	29 ± 2 (10)	33 ± 3 (10)	34 ± 3 (10)	36 ± 4 (10)	34 ± 4 (5)	37 ± 3 (5)

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals.

Table 12 Food consumption of female rats treated with C. I. azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Week of the administration period				Week of the recovery period	
	1	2	3	4	1	2
0	22 ± 2 (10)	22 ± 3 (10)	22 ± 2 (10)	24 ± 3 (10)	25 ± 2 (5)	22 ± 4 (5)
60	23 ± 2 (5)	22 ± 2 (5)	22 ± 2 (5)	25 ± 3 (5)		
250	22 ± 2 (5)	24 ± 2 (5)	21 ± 2 (5)	23 ± 3 (5)		
1000	22 ± 2 (10)	22 ± 2 (10)	23 ± 2 (10)	24 ± 2 (10)	20 ** ± 3 (5)	22 ± 2 (5)

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals.

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

Table 13-1 Urinary findings of male rats treated with C.I.azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Color		Cloudy		pH					Protein					
		PY	C	-	1+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+	3+
0	5	5		5						3	2			4	1	
60	5	5		5						2	3			3	2	
250	5	5		5						1	4			2	3	
1000	5	5		5						1	4			3	2	

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glucose				Ketone body				Occult blood				Urobilinogen			Bilirubin		
		-	±	1+	2+	-	±	1+	2+	-	±	1+	2+	0.1	1	2	-	1+	2+
0	5	5				1	4			5				5			5		
60	5	5				1	4			5				5			5		
250	5	5						5		5				5			5		
1000	5	5				1	4			5				5			5		

Color : PY(pale yellow), C(colorless)

Cloudy : - (negligible), 1+ (cloudy)

Protein : - (negligible), ±(15~30mg/dL), 1+ (30mg/dL), 2+ (100mg/dL), 3+ (300mg/dL)

Glucose : - (negligible), ±(0.1g/dL), 1+ (0.25g/dL), 2+ (0.5g/dL)

Ketone body : - (negligible), ±(5mg/dL), 1+ (15mg/dL), 2+ (40mg/dL)

Occult blood : - (negligible), ±(trace), 1+ (slight), 2+ (moderate)

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL

Bilirubin : - (negligible), 1+ (slight), 2+ (moderate)

Table 13-2 Urinary findings of male rats treated with C.Iazoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Color		Cloudy		pH					Protein						
		PY	C	-	1+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+	3+	
0	5	5		5					2	3				2	2	1	
1000	5	5		5					3	2				2	3		
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glucose				Ketone body				Occult blood			Urobilinogen			Bilirubin	
0	5	5				2	3			5			5			5	
1000	5	5				3	2			5			5			5	

Color :PY(pale yellow), C(colorless)

Cloudy : -(negligible), 1+(cloudy)

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dL), 1+(30mg/dL), 2+(100mg/dL), 3+(300mg/dL)

Glucose : -(negligible), ±(0.1g/dL), 1+(0.25g/dL), 2+(0.5g/dL)

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dL), 1+(15mg/dL), 2+(40mg/dL)

Occult blood : -(negligible), ±(trace), 1+(slight), 2+(moderate)

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL

Bilirubin : -(negligible), 1+(slight), 2+(moderate)

Table 14-1 Urinary findings of female rats treated with C.I.azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Color		Cloudy		pH					Protein					
		PY	C	-	1+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+	3+
0	5	5		5							5			3	2	
60	5	5		5							2	3		4	1	
250	5	5		5							1	4		4	1	
1000	5	5		5							1	4		4	1	

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glucose				Ketone body				Occult blood				Urobilinogen			Bilirubin		
		-	±	1+	2+	-	±	1+	2+	-	±	1+	2+	0.1	1	2	-	1+	2+
0	5	5				3	2			5				5			5		
60	5	5				3	2			5				5			5		
250	5	5				3	2			5				5			5		
1000	5	5				3	2			5				5			5		

Color : PY(pale yellow), C(colorless)

Cloudy : -(negligible), 1+(cloudy)

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dL), 1+(30mg/dL), 2+(100mg/dL), 3+(300mg/dL)

Glucose : -(negligible), ±(0.1g/dL), 1+(0.25g/dL), 2+(0.5g/dL)

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dL), 1+(15mg/dL), 2+(40mg/dL)

Occult blood : -(negligible), ±(trace), 1+(slight), 2+(moderate)

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL

Bilirubin : -(negligible), 1+(slight), 2+(moderate)

Table 14-2 Urinary findings of female rats treated with C.Iazoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Color		Cloudy		pH					Protein					
		PY	C	-	1+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+	3+
0	5	5		5					1	3	1			5		
1000	5	5		5					3	2		2		3		

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glucose				Ketone body				Occult blood				Urobilinogen			Bilirubin		
		-	±	1+	2+	-	±	1+	2+	-	±	1+	2+	0.1	1	2	-	1+	2+
0	5	5				4	1			5				5			5		
1000	5	5				4	1			5				5			5		

Color :PY(pale yellow), C(colorless)

Cloudy : -(negligible), 1+(cloudy)

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dL), 1+(30mg/dL), 2+(100mg/dL), 3+(300mg/dL)

Glucose : -(negligible), ±(0.1g/dL), 1+(0.25g/dL), 2+(0.5g/dL)

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dL), 1+(15mg/dL), 2+(40mg/dL)

Occult blood : -(negligible), ±(trace), 1+(slight), 2+(moderate)

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL

Bilirubin : -(negligible), 1+(slight), 2+(moderate)

Table 15-1

Hematological findings of male rats treated with C.I.lazoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)
0	5	764 \pm 43	15.1 \pm 0.5	46.0 \pm 1.3	61 \pm 2	19.7 \pm 0.6	32.7 \pm 0.5	34.9 \pm 12.1	12.4 \pm 0.3
60	5	771 \pm 46	15.1 \pm 1.0	46.1 \pm 2.6	60 \pm 1	19.6 \pm 0.3	32.7 \pm 0.3	29.5 \pm 6.0	13.0 \pm 0.6
250	5	738 \pm 41	14.8 \pm 0.8	45.2 \pm 2.4	61 \pm 1	20.0 \pm 0.6	32.6 \pm 0.3	33.1 \pm 9.3	12.9 \pm 0.3
1000	5	725 \pm 65	14.6 \pm 1.1	44.9 \pm 3.2	62 \pm 3	20.2 \pm 0.8	32.5 \pm 0.3	44.0 \pm 23.2	12.4 \pm 0.2
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	APTT (sec)	Plat. ($10^4/\mu\text{L}$)	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	Baso.	Eosin.	Neutro.	Lymph.	Mono.
0	5	19.8 \pm 1.3	132 \pm 15	78 \pm 23	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.2	13.3 \pm 2.8	83.1 \pm 2.6	2.6 \pm 0.6
60	5	20.8 \pm 1.7	129 \pm 11	64 \pm 8	0.0 \pm 0.0	0.9 \pm 0.4	15.6 \pm 7.7	81.5 \pm 7.6	2.0 \pm 1.0
250	5	18.9 \pm 1.6	132 \pm 17	69 \pm 18	0.0 \pm 0.0	0.8 \pm 0.2	15.2 \pm 3.6	81.3 \pm 4.7	2.7 \pm 1.1
1000	5	20.2 \pm 1.0	101 \pm 50	52 \pm 6	0.0 \pm 0.0	0.7 \pm 0.3	13.8 \pm 3.6	82.7 \pm 3.5	2.8 \pm 0.5

Each value is expressed as mean \pm S.D.

Table 15-2

Hematological findings of male rats treated with C.I.azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)
0	5	792 \pm 19	15.4 \pm 0.4	46.1 \pm 1.4	58 \pm 1	19.4 \pm 0.3	33.3 \pm 0.4	29.2 \pm 8.3	12.4 \pm 0.3
1000	5	777 \pm 35	14.7 \pm 0.7	44.3 \pm 1.7	57 \pm 1	18.9 \pm 0.6	33.1 \pm 0.4	30.4 \pm 9.3	12.6 \pm 0.2
<hr/>									
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	APTT (sec)	Plat. ($10^4/\mu\text{L}$)	WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	Baso.	Eosin.	Neutro.	Lymph.	Mono.
0	5	19.8 \pm 1.1	129 \pm 14	88 \pm 26	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.5	12.5 \pm 2.8	83.9 \pm 3.5	2.5 \pm 0.8
1000	5	20.2 \pm 0.7	129 \pm 14	71 \pm 24	0.0 \pm 0.0	0.9 \pm 0.4	14.4 \pm 3.6	82.2 \pm 3.3	2.5 \pm 0.7

Each value is expressed as mean \pm S.D.

Table 16-1

Hematological findings of female rats treated with C.I.azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	RBC (10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)
0	5	768 ± 23	14.8 ± 0.6	44.0 ± 2.2	58 ± 2	19.2 ± 0.7	33.6 ± 0.5	23.8 ± 9.1	12.8 ± 0.2
60	5	780 ± 25	15.0 ± 0.6	44.4 ± 2.1	57 ± 2	19.3 ± 0.4	33.8 ± 0.6	13.8 ± 6.6	12.6 ± 0.3
250	5	782 ± 27	15.4 ± 0.9	45.3 ± 2.6	58 ± 1	19.6 ± 0.6	33.9 ± 0.2	15.7 ± 3.2	12.7 ± 0.2
1000	5	762 ± 21	15.0 ± 0.3	44.8 ± 1.2	59 ± 3	19.7 ± 0.4	33.4 ± 0.7	18.3 ± 5.4	12.4 ± 1.0
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	APTT (sec)	Plat. (10 ³ /μL)	WBC (10 ³ /μL)	Baso.	Eosin.	Neutro.	Lymph.	Mono.
0	5	18.5 ± 1.2	125 ± 11	41 ± 21	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.8	16.5 ± 2.5	79.4 ± 2.8	2.5 ± 1.0
60	5	17.9 ± 0.9	120 ± 14	47 ± 13	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.3	13.5 ± 3.0	82.8 ± 3.0	2.2 ± 1.0
250	5	17.7 ± 1.1	125 ± 9	47 ± 12	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.4	19.4 ± 5.7	77.1 ± 5.0	2.2 ± 0.6
1000	5	18.1 ± 1.4	115 ± 21	49 ± 16	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.4	13.5 ± 5.2	82.0 ± 5.4	3.2 ± 0.8

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 16-2

Hematological findings of female rats treated with C.I.azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)
0	5	767 ± 33	14.9 ± 0.5	44.2 ± 1.5	58 ± 1	19.5 ± 0.5	33.8 ± 0.4	19.0 ± 6.5	13.2 ± 0.2
1000	5	788 ± 67	15.0 ± 0.8	44.4 ± 2.5	57 ± 3	19.1 ± 1.2	33.8 ± 0.2	17.3 ± 4.2	12.9 ± 0.3
<hr/>									
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	APTT (sec)	Plat. ($10^4/\mu\text{L}$)	WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	Baso.	Eosin.	Neutro.	Lymph.	Mono.
0	5	17.7 ± 1.0	110 ± 8	58 ± 8	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1	12.0 ± 5.9	84.3 ± 5.6	2.5 ± 0.4
1000	5	18.0 ± 2.2	126 ± 35	42 ± 15	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.8	14.0 ± 7.0	81.6 ± 7.5	2.7 ± 0.6

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 17-1

Blood biochemical findings of male rats treated with C.I.azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

〈 At end of the administration period 〉

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	LDH (IU/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Ch. (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
0	5	270 \pm 67	71 \pm 10	35 \pm 7	670 \pm 168	0.29 \pm 0.10	5.78 \pm 0.17	2.86 \pm 0.19	0.98 \pm 0.08	75 \pm 11	43 \pm 10
60	5	312 \pm 72	73 \pm 6	38 \pm 8	753 \pm 187	0.38 \pm 0.23	5.64 \pm 0.10	2.81 \pm 0.04	1.00 \pm 0.04	69 \pm 11	53 \pm 23
250	5	284 \pm 84	72 \pm 4	35 \pm 4	825 \pm 75	0.47 \pm 0.20	5.75 \pm 0.21	2.86 \pm 0.13	1.00 \pm 0.10	67 \pm 11	44 \pm 16
1000	5	255 \pm 64	76 \pm 6	37 \pm 3	801 \pm 189	0.63 \pm 0.27	5.73 \pm 0.29	2.81 \pm 0.23	0.97 \pm 0.06	72 \pm 11	51 \pm 14
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glu. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0	5	162 \pm 28	15.2 \pm 2.5	0.37 \pm 0.03	0.38 \pm 0.05	11.0 \pm 0.2	8.9 \pm 0.6	146 \pm 1	5.04 \pm 0.21	106 \pm 1	
60	5	152 \pm 9	14.1 \pm 2.2	0.33 * \pm 0.02	0.41 \pm 0.06	10.8 \pm 0.2	9.0 \pm 0.3	147 \pm 1	4.88 \pm 0.25	106 \pm 2	
250	5	165 \pm 22	15.4 \pm 2.8	0.33 \pm 0.02	0.35 \pm 0.04	10.7 \pm 0.3	8.6 \pm 0.4	147 \pm 1	4.70 \pm 0.36	106 \pm 2	
1000	5	146 \pm 13	11.1 \pm 3.6	0.33 * \pm 0.03	0.41 \pm 0.02	10.8 \pm 0.3	8.7 \pm 0.4	147 \pm 1	4.68 \pm 0.28	106 \pm 1	

Each value is expressed as mean \pm S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 17-2

Blood biochemical findings of male rats treated with C.I.azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

⟨ At end of the recovery period ⟩

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	LDH (IU/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Ch. (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
0	5	291 ± 14	71 ± 7	40 ± 8	493 ± 51	0.32 ± 0.17	5.84 ± 0.13	2.74 ± 0.14	0.89 ± 0.07	72 ± 12	88 ± 33
1000	5	255 ± 33	73 ± 9	40 ± 7	531 ± 99	0.55 ± 0.23	5.66 ± 0.13	2.70 ± 0.12	0.91 ± 0.05	64 ± 5	82 ± 37
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glu. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0	5	160 ± 7	16.9 ± 1.9	0.44 ± 0.04	0.36 ± 0.06	10.7 ± 0.2	8.0 ± 0.4	145 ± 1	4.72 ± 0.23	107 ± 1	
1000	5	159 ± 12	15.0 ± 2.7	0.43 ± 0.03	0.40 ± 0.04	10.5 ± 0.2	7.7 ± 0.6	144 ± 1	4.94 ± 0.23	107 ± 1	

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 18-1

Blood biochemical findings of female rats treated with C.I.azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

⟨ At end of the administration period ⟩

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	LDH (IU/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Ch. (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
0	5	466 ± 184	78 ± 13	28 ± 4	472 ± 85	0.72 ± 0.44	6.01 ± 0.24	3.12 ± 0.15	1.09 ± 0.09	68 ± 9	16 ± 8
60	5	414 ± 99	68 ± 4	29 ± 3	396 ± 78	0.87 ± 0.31	6.00 ± 0.20	3.18 ± 0.31	1.13 ± 0.16	86 ± 23	25 ± 12
250	5	467 ± 140	77 ± 11	31 ± 1	410 ± 58	0.72 ± 0.35	6.14 ± 0.23	3.26 ± 0.27	1.13 ± 0.12	79 ± 16	26 ± 7
1000	5	369 ± 60	80 ± 14	30 ± 6	512 ± 102	0.91 ± 0.44	5.68 ± 0.17	2.88 ± 0.12	1.03 ± 0.06	74 ± 19	27 ± 13
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glu. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0	5	128 ± 10	12.7 ± 1.5	0.41 ± 0.06	0.26 ± 0.02	10.5 ± 0.2	7.1 ± 0.8	148 ± 2	4.83 ± 0.44	109 ± 1	
60	5	133 ± 20	14.8 ± 3.1	0.47 ± 0.15	0.26 ± 0.02	10.8 ± 0.2	7.9 ± 0.5	147 ± 2	4.86 ± 0.16	109 ± 3	
250	5	146 ± 13	15.0 ± 2.7	0.41 ± 0.05	0.26 ± 0.02	10.5 ± 0.5	7.5 ± 1.6	147 ± 1	4.86 ± 0.30	109 ± 1	
1000	5	128 ± 19	13.8 ± 2.7	0.42 ± 0.03	0.24 ± 0.03	10.6 ± 0.4	7.7 ± 0.4	145 ± 1	4.94 ± 0.32	108 ± 2	

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 18-2

Blood biochemical findings of female rats treated with C.I.azoic coupling component 2
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	LDH (IU/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Cho. (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
0	5	337 \pm 78	73 \pm 14	29 \pm 5	295 \pm 78	0.76 \pm 0.26	5.97 \pm 0.24	3.06 \pm 0.20	1.06 \pm 0.13	72 \pm 5	20 \pm 8
1000	5	546 * \pm 147	121 \pm 43	36 * \pm 4	334 \pm 24	0.86 \pm 0.88	6.05 \pm 0.23	3.13 \pm 0.15	1.08 \pm 0.08	77 \pm 18	26 \pm 14
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glu. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0	5	142 \pm 22	15.5 \pm 2.4	0.48 \pm 0.02	0.29 \pm 0.02	10.8 \pm 0.2	7.2 \pm 1.0	145 \pm 1	5.07 \pm 0.37	108 \pm 2	
1000	5	133 \pm 18	14.5 \pm 3.6	0.49 \pm 0.04	0.29 \pm 0.03	10.6 \pm 0.2	7.0 \pm 0.5	145 \pm 2	4.82 \pm 0.89	107 \pm 3	

Each value is expressed as mean \pm S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 19 Incidence of necropsy findings of male rats treated with C.I.azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Organ	: Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period		
			Dose(mg/kg/day)	0	60	250	1000	0	1000
			Fate	KA	KA	KA	KA	KR	KR
			No.of animals	5	5	5	5	5	5
Testis	: Small, left side	-		5	5	5	5	4	5
		+		0	0	0	0	1	0

KA : Killed by design at the end of administration period.

KR : Killed by design at the end of recovery period.

Grade, - : Negative; + : Slight.

Table 20 Incidence of necropsy findings of female rats treated with C.I.azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Organ	: Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period		
			Dose(mg/kg/day)		0	60	250	1000	0
			Fate	KA	KA	KA	KA	KR	KR
			No.of animals	5	5	5	5	5	5
Abnormality				0	0	0	0	0	0

KA : Killed by design at the end of administration period.

KR : Killed by design at the end of recovery period.

Table 21-1 Absolute and relative organ weights of male rats treated with C.I.azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the administration period >

	Dose (mg/kg/day)	No. of Animals	Body weight (g)	Brain (g)	Thymus (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Adrenal gland (mg)	Spleen (g)	Testis (g)	Epididy- mis (g)	Pituitary gland (mg)	Thyroid gland (mg)
Absolute	0	5	330 ±31	1.92 ±0.06	0.57 ±0.20	1.09 ±0.10	10.32 ±1.47	2.62 ±0.28	59.8 ±14.0	0.70 ±0.13	3.06 ±0.09	0.75 ±0.03	11.1 ±0.8	24.7 ±3.6
	60	5	318 ±33	1.89 ±0.08	0.58 ±0.26	1.15 ±0.04	9.78 ±1.54	2.52 ±0.37	56.8 ±8.9	0.72 ±0.16	3.34 * ±0.21	0.80 ±0.12	10.7 ±1.1	24.1 ±2.1
	250	5	345 ±20	1.93 ±0.03	0.58 ±0.13	1.16 ±0.13	11.04 ±1.19	2.67 ±0.21	61.0 ±6.1	0.77 ±0.12	3.24 ±0.20	0.75 ±0.07	12.2 ±0.8	28.9 ±2.4
	1000	5	342 ±33	0.98 ±0.07	0.54 ±0.12	1.16 ±0.06	10.99 ±1.36	2.67 ±0.07	66.9 ±12.8	0.78 ±0.24	3.41 ** ±0.06	0.77 ±0.05	11.8 ±2.3	28.1 ±4.0
Relative @	0	5	330 ±31	0.58 ±0.05	0.17 ±0.06	0.33 ±0.03	3.11 ±0.21	0.79 ±0.05	17.9 ±3.0	0.21 ±0.03	0.93 ±0.11	0.23 ±0.02	3.4 ±0.1	7.6 ±1.6
	60	5	318 ±33	0.60 ±0.06	0.18 ±0.06	0.37 ±0.04	3.06 ±0.18	0.79 ±0.05	17.9 ±2.8	0.23 ±0.05	1.06 ±0.09	0.25 ±0.03	3.4 ±0.3	7.7 ±1.3
	250	5	345 ±20	0.56 ±0.03	0.17 ±0.03	0.34 ±0.03	3.20 ±0.24	0.78 ±0.03	17.7 ±1.3	0.22 ±0.02	0.94 ±0.06	0.22 ±0.02	3.5 ±0.2	8.4 ±0.6
	1000	5	342 ±33	0.58 ±0.06	0.16 ±0.03	0.34 ±0.03	3.21 ±0.16	0.79 ±0.06	19.5 ±2.6	0.22 ±0.05	1.00 ±0.11	0.23 ±0.02	3.4 ±0.4	8.2 ±0.8

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

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

Table 21-2 Absolute and relative organ weights of male rats treated with C.I.lazoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	Body weight (g)	Brain (g)	Thymus (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Adrenal gland (mg)	Spleen (g)	Testis (g)	Epididy- mis (g)	Pituitary gland (mg)	Thyroid gland (mg)	
Absolute	0	5	415 ±8	1.97 ±0.07	0.56 ±0.08	1.28 ±0.06	12.32 ±0.72	2.90 ±0.21	68.1 ±8.7	0.71 ±0.14	3.25 ±0.50	0.10 ±0.18	13.0 ±0.6	27.7 ±2.5
	1000	5	410 ±46	1.94 ±0.05	0.50 ±0.05	1.23 ±0.06	11.70 ±1.89	2.76 ±0.22	62.6 ±10.1	0.81 ±0.12	3.38 ±0.16	1.05 ±0.07	12.3 ±1.4	26.4 ±3.4
Relative @	0	5	415 ±8	0.48 ±0.02	0.13 ±0.02	0.31 ±0.02	2.97 ±0.17	0.70 ±0.04	16.4 ±2.0	0.17 ±0.03	0.78 ±0.11	0.24 ±0.04	3.1 ±0.1	6.7 ±0.6
	1000	5	410 ±46	0.48 ±0.05	0.12 ±0.01	0.30 ±0.03	2.84 ±0.20	0.68 ±0.06	15.3 ±2.0	0.20 ±0.02	0.83 ±0.06	0.26 ±0.03	3.0 ±0.3	6.5 ±0.9

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

Table 22-1 Absolute and relative organ weights of female rats treated with C.I.azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	Body weight (g)	Brain (g)	Thymus (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Adrenal gland (mg)	Spleen (g)	Ovary (mg)	Pituitary gland (mg)	Thyroid gland (mg)
Absolute	0	5	208 ±18	1.78 ±0.04	0.47 ±0.11	0.79 ±0.04	6.19 ±0.65	1.69 ±0.23	67.0 ±3.1	0.45 ±0.08	93.5 ±16.9	14.4 ±2.0
	60	5	209 ±19	1.81 ±0.05	0.45 ±0.08	0.77 ±0.07	6.21 ±0.51	1.60 ±0.10	67.9 ±11.8	0.49 ±0.10	85.9 ±9.1	12.9 ±1.6
	250	5	205 ±16	1.75 ±0.03	0.42 ±0.04	0.75 ±0.04	6.10 ±0.41	1.61 ±0.10	63.6 ±4.5	0.43 ±0.05	87.5 ±28.9	12.4 ±1.0
	1000	5	212 ±12	1.87 * ±0.08	0.46 ±0.07	0.80 ±0.06	6.42 ±0.70	1.63 ±0.14	75.9 ±5.6	0.55 ±0.19	87.1 ±13.0	11.8 ±1.1
Relative @	0	5	208 ±18	0.86 ±0.07	0.23 ±0.04	0.38 ±0.03	2.98 ±0.11	0.81 ±0.07	32.5 ±4.5	0.21 ±0.02	44.8 ±5.6	6.9 ±0.7
	60	5	209 ±19	0.87 ±0.09	0.21 ±0.03	0.37 ±0.05	2.97 ±0.10	0.77 ±0.03	32.3 ±3.3	0.23 ±0.04	41.3 ±5.3	6.1 ±0.5
	250	5	205 ±16	0.86 ±0.06	0.21 ±0.01	0.37 ±0.02	2.98 ±0.07	0.79 ±0.05	31.2 ±3.1	0.21 ±0.01	42.6 ±12.7	6.1 ±0.7
	1000	5	212 ±12	0.88 ±0.04	0.22 ±0.03	0.38 ±0.01	3.03 ±0.18	0.77 ±0.04	35.9 ±3.6	0.26 ±0.07	41.2 ±6.7	5.6 * ±0.6

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 22.2 Absolute and relative organ weights of female rats treated with C.Iazoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	Body weight (g)	Brain (g)	Thymus (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Adrenal gland (mg)	Spleen (g)	Ovary (mg)	Pituitary gland (mg)	Thyroid gland (mg)	
Absolute	0	5	242 ±13	1.89 ±0.06	0.42 ±0.06	0.87 ±0.07	6.44 ±0.71	1.71 ±0.10	78.1 ±15.4	0.53 ±0.07	84.2 ±5.6	14.0 ±2.0	22.2 ±2.6
	1000	5	223 ±17	1.86 ±0.04	0.37 ±0.07	0.81 ±0.06	6.20 ±0.71	1.67 ±0.09	70.6 ±16.8	0.49 ±0.06	88.9 ±8.1	14.2 ±2.8	20.0 ±1.6
Relative @	0	5	242 ±13	0.78 ±0.04	0.18 ±0.03	0.36 ±0.01	2.66 ±0.17	0.71 ±0.02	32.2 ±5.5	0.22 ±0.03	34.8 ±1.0	5.8 ±0.7	9.1 ±0.7
	1000	5	223 ±17	0.84 ±0.06	0.17 ±0.03	0.36 ±0.01	2.78 ±0.18	0.75 * ±0.04	31.8 ±7.8	0.22 ±0.02	40.1 ±4.5	6.4 ±1.2	9.0 ±1.0

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 23 Incidence of histopathological findings of male rats treated with C.I.azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Organ	Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period	
			Dose(mg/kg/day)					KR
				KA Fate	0 No.of animals	60 5	250 5	KR 5
Lung	: Accumulation, foam cell	-	KA	3	#	#	3	#
		+		2	#	#	2	#
Liver	: Necrosis, focal	-	KA	3	#	#	3	#
		+		2	#	#	2	#
	Microgramuloma	-	KA	3	#	#	3	#
		+		2	#	#	2	#
Glandular stomach	: Dilatation, fundic gland	-	KA	4	#	#	5	#
		+		1	#	#	0	#
Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	-	KA	2	#	#	2	#
		+		3	#	#	3	#
	Basophilic tubules	-	KA	3	#	#	3	#
		+		2	#	#	2	#
	Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-	KA	4	#	#	5	#
		+		1	#	#	0	#
Thymus	: Hemorrhage	-	KA	4	#	#	3	#
		+		1	#	#	2	#
Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary	-	KA	0	#	#	0	#
		+		5	#	#	5	#
	Deposit, pigment, brown	-	KA	0	#	#	0	#
		+		5	#	#	5	#
Testis	: Atrophy, seminiferous tubule, unilateral	-	KA	5	#	#	5	0/1 ^a
		+		0	#	#	0	1/1 ^a
Prostate	: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	-	KA	4	#	#	4	#
		+		1	#	#	1	#

KA : Killed by design at the end of administration period, KR : Killed by design at the end of recovery period, #:Not examined.

Grade, - : Negative; + : Slight.

a : Examined the animal with a macroscopic abnormality.

No abnormalities were detected in the brain, pituitary, thyroid, parathyroid, trachea, heart, small intestine, large intestine, adrenal, urinary bladder, epididymis, seminal vesicle, spinal cord, sciatic nerve, bone marrow, lymph nodes and eye ball from animals of control and 1000 mg/kg group.

Table 24-1 Incidence of histopathological findings of female rats treated with C.Iazoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Organ	Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period	
			Dose(mg/kg/day)		0		1000	
			Fate	No.of animals	KA 5	KA 5	KA 5	KA 5
Lung	: Accumulation, foam cell	-			4	#	#	4
		+			1	#	#	1
	Mineralization, artery	-			3	#	#	2
		+			2	#	#	3
Heart	: Myocardial degeneration/fibrosis	-			5	#	#	5
		+			0	#	#	0
Liver	: Necrosis, focal	-			5	#	#	5
		+			0	#	#	1
	Microgramuloma	-			4	#	#	2
		+			1	#	#	2
		++			0	#	#	0
	Degeneration, fatty, hepatocyte, diffuse	-			3	#	#	4
		+			2	#	#	1
Glandular stomach	: Dilatation, fundic gland	-			4	#	#	4
		+			1	#	#	#
Kidney	: Basophilic tubules	-			4	#	#	3
		+			1	#	#	2
	Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-			4	#	#	5
		+			1	#	#	0
	Cyst, solitary	-			4	#	#	5
		+			1	#	#	0
	Fibrosis, cortex, focal, unilateral	-			5	#	#	5
		+			0	#	#	0
	Dilatation, tubular	-			5	#	#	3
		+			0	#	#	2
	Dilatation, pervis, unilateral	-			5	#	#	5
		+			0	#	#	0

KA : Killed by design at the end of administration period, KR : Killed by design at the end of recovery period, #:Not examined.

Grade, - : Negative; + : Slight; ++ : Moderate.

No abnormalities were detected in the brain, pituitary, parathyroid, thymus, trachea, small intestine, large intestine, adrenal, urinary bladder, ovary, uterus, vagina, spinal cord, sciatic nerve, bone marrow, lymph nodes and eye ballfrom animals of control and 1000 mg/kg group.

Table 24-2 Incidence of histopathological findings of female rats treated with C.I.azoic coupling component 2 in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Organ	Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period	
			Dose(mg/kg/day)		0	60	250	1000
			Fate	No.of animals	KA	KA	KA	KA
Thyroid	: Ultimobranchial remnant	-			4	#	#	5
		+			1	#	#	0
Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary	-			1	#	#	0
		+			4	#	#	5
	Deposit, pigment, brown	-			1	#	#	0
		+			4	#	#	5
							5	5

KA : Killed by design at the end of administration period, KR : Killed by design at the end of recovery period, #:Not examined.

Grade, - : Negative; + : Slight.

a : Examined the animal with a macroscopic abnormality.

No abnormalities were detected in the brain, pituitary, parathyroid, thymus, trachea, small intestine, large intestine, adrenal, urinary bladder, ovary, uterus, vagina, spinal cord, sciatic nerve, bone marrow, lymph nodes and eye ball from animals of control and 1000 mg/kg group.