

食薬セ研第10-1624号

2000年 7月25日

o-ジクロロベンゼンのラットに
おける急性経口投与毒性試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目 次】

| | |
|------------------------|----|
| 要約 | 1 |
| 緒言 | 2 |
| 方法 | 3 |
| 1. 被験物質 | 3 |
| 2. 使用動物および飼育方法 | 3 |
| 3. 投与検体の調製 | 4 |
| 4. 投与量の設定および投与方法 | 4 |
| 5. 観察および検査 | 5 |
| 6. データ解析法 | 6 |
| 結果 | 7 |
| 1. 死亡動物 | 7 |
| 2. 一般状態 | 7 |
| 3. 体重推移 | 8 |
| 4. 病理学検査 | 8 |
| 考察 | 9 |
| 文献 | 11 |

Tables 1 ~ 5

【要 約】

o-ジクロロベンゼン（以下 DCB と略記）の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] ラットにおける急性経口投与毒性試験を実施した。

1 群 5 匹からなる 5 週齢の雄ラットに DCB 500、1000 および 2000 mg/kg を、雌ラットに DCB 2000 mg/kg をそれぞれ単回経口投与し、観察第 1 日（投与日）から 14 日間観察を行い、観察第 15 日に屠殺して剖検した。また、媒体対照群として、雄 5 匹にコーン油を 10 mL/kg 投与して、同様に観察した。

その結果、雄では、2000 mg/kg 投与群で、投与当日に自発運動の減少、歩行失調および流涙、横臥位、腹臥位、歩行不能、歩行困難、振戦、呼吸不整、半眼、流涎等の毒性症状が観察され、3 例では観察第 2 日にも流涎を除く多くの症状が持続して、観察第 2、3、4 日にそれぞれ 1 例ずつ死亡した。同群の生存した 2 例では観察第 2 日には自発運動や排便量の減少がみられたもののその後回復し、観察第 5 日以降特記すべき変化は認められなかった。500 mg/kg 投与群では、投与当日、腹臥位、自発運動の減少、半眼、流涎等が、1000 mg/kg 投与群の雄ではこれらに加えて体温低下、流涙、閉眼がみられ、観察第 2 日に肛門周囲の汚れ、餌こぼし、排便量の減少がみられたが、その後一般状態に変化はみられなかった。2000 mg/kg 投与群の雌では、雄と同様の所見がみられたものの、その程度はやや弱く、観察第 6 日以降には異常所見は認められなかった。

また、雄では 500 mg/kg 投与群で体重増加抑制が、1000、2000 mg/kg 投与群ならびに雌の 2000 mg/kg 投与群で体重減少あるいは増加抑制がみられ、投与量の増加に伴ってその程度は強く、体重増加に転じるまでの期間も長い傾向がみられた。

病理学的には、観察第 3 および 4 日に死亡した 2000 mg/kg 投与群の雄 2 例で肝臓の淡色化がみられ、組織学的には 1 例で軽度の小葉中心性の壊死および空胞変性が、1 例で中等度の小葉中心性壊死が観察された。観察第 2 日の死亡例では肉眼的には変化はみられなかったものの、組織学的には軽度の小葉中心性の肝細胞細胞質の好酸性変化が観察された。また、観察第 3 および 4 日に死亡した雄 2 例では、膀胱内に暗色液の貯留が認められた。観察第 15 日剖検例では、肉眼的には変化はみられなかったが、2000 mg/kg 投与群の雄 1 例で軽度の小葉中心性の肝細胞の肥大が観察された。

これらのことより、本試験条件下における DCB の LD₅₀ は、雄では 2000 mg/kg 付近、雌では 2000 mg/kg を上回ると推定された。

【緒 言】

o-ジクロロベンゼン（以下 DCB と略記）は、ワックスやゴムの溶剤、殺虫剤、燻蒸剤等に用いられており¹⁾、ラットにおける単回経口投与時の LD₅₀ は 500 mg/kg²⁾あるいは 2138 mg/kg³⁾であることが報告されている。今回、OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、DCB の安全性確認の資料を得るために、ラットにおける急性経口投与毒性試験を実施したので、その結果を報告する。

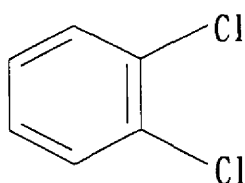
本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401] 急性経口毒性試験（1987年2月24日採択）」および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として、*o*-ジクロロベンゼン（以下 DCB と略記）を用いた。本被験物質は、別名を 1,2-ジクロロベンゼンといい、英名は *o*-dichlorobenzene であり、CAS No. 95-50-1、分子量 146.94、分子式 $C_6H_4Cl_2$ 、分配係数 3.38、融点（凝固点） $-17^{\circ}C$ 、沸点 $180^{\circ}C$ 、蒸気圧 0.13 kPa ($20^{\circ}C$) の無色透明の液体である。DCB の構造式を以下に示す。

構造式



本試験には、
より提供された DCB（ロット番号：
純度：
99.7%）を用いた。受領物質は、使用時まで被験物質受領保管室において、室温で保管した。

2. 使用動物および飼育方法

4 週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS, SPF] 雌雄ラットを、日本チャールス・リバー株式会社筑波飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて 7 日間予備飼育した。予備飼育中、動物の一般状態に異常は認められなかった。試験には、雄 20 匹雌 5 匹を用い、雄は検疫終了時の測定体重を基に体重別層化無作為抽出法により 1 群 5 匹からなる 4 群に分け、雌は入荷番号の若い方から 5 匹を選んで 1 群とした。投与開始時の週齢は、雌雄ともに 5 週齢であった（注）。

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージ（220w×270d×190hmm）に 1 匹ずつ収容し、基準温度 $24 \pm 1^{\circ}C$ 、基準湿度 50~65%、換気回数約 15 回/時、照明 12 時間（7 時~19

（注） 動物入荷日：1999年4月7日
入荷時匹数：雄23匹、雌6匹
入荷時体重：雄 81.0~88.6 g、雌 75.4~84.9 g
投与日：1999年4月14日
投与時体重：雄 117.8~140.0 g、雌 108.6~116.4 g

時点灯)に制御された飼育室で、固型飼料(CE-2、日本クレア株式会社)および水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ 24.0~25.0℃、55.0~67.0%で、湿度が基準値をわずかながらはずれる値を示したが、1時間以内の逸脱であり、それ以外は基準の範囲内であった。また、供給した飼料および水に試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

動物の個体識別は、各動物の尾にフェルトペンで雌雄に一連の番号を付した。また、各飼育ケージには個体識別の補助として試験計画番号、投与量、性および動物番号を記入した動物カードを掛けた。

3. 投与検体の調製

投与検体の調製においては、各濃度毎に被験物質を秤量し、所定濃度となるようにコーン油(英名: Corn oil、商品名: トウモロコシ油、ロット番号: V8P7069、ナカライテスク株式会社)を加えて溶解し、投与時まで室温遮光下で保存し、調製2日後に使用した。

本試験に先立ち、本被験物質の28日間反復経口投与毒性試験(試験計画番号: C-98-026)において、被験物質の 0.2 および 20 w/v%の調製検体の、室温、遮光条件下での10日間の安定性を確認した(Appendix A)。また、各濃度の投与検体について、被験物質の含量を測定し、規定範囲内にあることを確認した(Appendix B)。なお、本投与検体は溶液であることから、均一性試験は実施しなかった。

調製検体中の被験物質の濃度は、高速液体クロマトグラフ法により測定した(Appendix C)。なお、試験計画書には、調製検体の被験物質濃度の測定に関して、検量線の範囲を10~50 µg/mL と記載したが、実際の操作時にその範囲を 10~40 µg/mL とした試験計画書からの逸脱があった。本件については、検量線の範囲が 10~40 µg/mL であっても被験物質の濃度を検量線から読み取るのに支障はなく、投与検体の安定性および含量の測定に影響はないと判断した。

4. 投与量の設定および投与方法

本試験における投与量は、投与量設定のための予備試験(試験計画番号: A-98-061)の結果に基づいて決定した。すなわち、文献調査の結果²⁾、本被験物質のラットにおける LD₅₀ は 500 mg/kg であることから、250、500 および 1000 mg/kg を5週齢の雌雄ラ

ット各3例に投与した結果、いずれの投与量においても半眼あるいは閉眼、自発運動の減少、体重増加抑制が認められたが、死亡例はみられなかった。一方、他の文献³⁾でのLD₅₀は2138 mg/kgであった。これらのことから、片性(雄)について、500、1000および2000 mg/kg(公比2)の3用量を設定した。また、予備試験では明らかな性差は認められなかったことから、雌については、明らかな毒性が発現し、かつ死亡しないと考えられる用量として2000 mg/kgの1用量を設定した。

投与容量は体重1 kg 当たり 10 mL とし、動物を投与前日の16時以降絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。投与は午前10時24分～10時45分の間に行い、給餌は投与後約3時間に行った。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は次の通りである。

| 投与物質 | 投与量 (mg/kg) | 濃度 (w/v%) | 投与容量 (mL/kg) | 動物番号 | |
|-------|----------------|--------------|-----------------|-------|-------|
| | | | | 雄 | 雌 |
| コーン油 | 0 | 0 | 10 | 1～5 | |
| D C B | 500 | 5.0 | 10 | 6～10 | |
| D C B | 1000 | 10 | 10 | 11～15 | |
| D C B | 2000 | 20 | 10 | 16～20 | 21～25 |

5. 観察および検査

観察第1日(投与日)から14日間にわたって死亡の有無を確認し、各動物の一般状態を観察した。観察は投与日においては投与直後から1時間まで連続して行い、その後は投与後6時間まで約1時間間隔で実施した。観察第2日から15日までは毎日1回行った。

体重は生存した全例について、投与直前、観察第2、4、8、11および15日に測定した。また、死亡例については死亡発見時に体重を測定した。

剖検は、死亡例では死亡発見後可及的速やかに、生存例では観察第15日にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血屠殺して実施した。剖検時に、脳、下垂体、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、生殖器、顎下腺、甲状腺、副腎、大動脈、気管、食道、消化管、膀胱、眼球(ハーダー腺を含む)、皮膚、乳腺、頸部および腸間膜リンパ節、大腿骨骨髄および舌の肉眼観察を行った。これらのうち、2000 mg/kg 投与群の雄2例(動物番号:16、18)については心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および胃を、同群の他の雄2例(動物番号:19、20)についてはこれらの器官に加えて膀胱を0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。

2000 mg/kg 投与群の死亡例 2 例で肝臓の淡色化がみられ、文献調査により肝臓に変化が認められていることから⁴⁾、固定した器官のうち、全例の肝臓について組織検査を実施した。すなわち、肝臓を固定後、パラフィン包埋し、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、光学顕微鏡を用いてその組織を観察した。

6. データ解析法

体重の測定値について、平均値および標準偏差を求めた。

【結 果】

1. 死亡動物 (Table 1)

雄では、2000 mg/kg 投与群の3例が、観察第2、3、4日にそれぞれ1例ずつ死亡した。雌の2000 mg/kg 投与群では死亡例はなかった。

2. 一般状態 (Table 2-1~2-2)

雄では、媒体対照群の3例で粘液便の排泄が投与後約2時間以降に観察され、1例では肛門周囲の汚れもみられた。

500 mg/kg 投与群では、半眼が全例で投与後約1~6時間の間に、流涎が3例で投与後約1~4時間にみられたほか、投与日に自発運動の減少が2例で、腹臥位が1例で、粘液便および肛門周囲の汚れが1例で観察された。観察第2日には、餌こぼしが2例でみられたほか、肛門周囲の汚れが1例で投与日に引き続いてみられた。

1000 mg/kg 投与群では、半眼あるいは閉眼が全例で投与後約2~3時間以降に、流涎が4例で投与後2~5時間に、流涙が3例で投与後1時間以内からみられた。その他、投与当日に、1例で投与後3時間以降に自発運動の減少、体温低下および腹臥位がみられ、自発運動の減少は他の1例でも投与後3~5時間に観察された。また、粘液便が1例でみられた。観察第2日には、排便量の減少が4例で、餌こぼしが2例でみられた。

2000 mg/kg 投与群では、投与当日、歩行失調および自発運動の減少が全例で、横臥あるいは腹臥位が4例で投与後1時間以内~3時間以降にみられたほか、半眼あるいは閉眼が3例で、歩行不能が2例で、歩行困難が1例で観察された。また、流涎が全例で投与後1時間以内~約2時間以降に観察された。その他、投与日に振戦、呼吸不整、赤色涙あるいは流涎が各1例でみられた。観察第2日には、2例で横臥位、緩徐呼吸および体温低下が観察され、これらの例は観察第2あるいは3日に死亡した。また、1例では、観察第2日に自発運動の減少がみられ、排便量も減少し、観察第3日に横臥位、呼吸不整、体温低下が観察され、排便はみられず、観察第4日に死亡した。他の2例では、自発運動の減少が観察第2あるいは3日まで、排便量の減少が観察第4日までみられたほか、1例で肛門周囲の汚れが観察第2日にみられたが、その後は特記すべき変化は認められなかった。

雌の2000 mg/kg 投与群では、投与当日、自発運動の減少、半眼あるいは閉眼が全例で、歩行失調および流涎が4例で、腹臥位および流涎が2例で投与後1時間以内~4時間以降

にそれぞれ観察された。観察第2日には、自発運動の減少が2例で、腹臥位が3例で、閉眼が1例でみられたほか、排便量の減少が全例でみられた。観察第3日には、腹臥位が3例で依然として観察され、1例では閉眼が、他の1例ではうずくまりや立毛もみられ、排便は観察されなかったが、他の2例では肛門周囲の汚れがみられただけであった。観察第4日には、自発運動の減少はみられず、肛門周囲の汚れが3例で、排便量の減少が2例でみられ、観察第5日も同様の所見が観察されたが、観察第6日以降特記すべき変化はみられなかった。

3. 体重推移 (Table 3)

雄では、観察第2日に、500 mg/kg 投与群で体重増加抑制が、1000 mg/kg 投与群で体重減少あるいは体重増加抑制がみられたが、その後体重増加がみられ、観察第15日の体重は媒体対照群の体重と同程度であった。2000 mg/kg 投与群では、観察第2日に4例で体重が減少し、1例では体重増加抑制がみられたが、生存した2例では観察第8日から増加に転じ、観察第15日の体重は対照群のそれと大きな差はなかった。

雌の2000 mg/kg 投与群では、観察第2日には全例で体重が減少し、観察第4日には2例で低下、他の3例で増加抑制がみられたが、観察第8日からは増加に転じた。

4. 病理学検査 (Table 4～5)

死亡例の剖検では、観察第2日に死亡した2000 mg/kg 投与群の雄1例には著変は認められなかった。観察第3および4日に死亡した同群の雄2例では、肝臓の淡色化がみられ、膀胱内には暗色液の貯留が認められた。観察第15日に実施した剖検では、変化はみられなかった。

2000 mg/kg 投与群の雄4例の肝臓について実施した組織検査では、観察第2日死亡例で軽度の小葉中心性の肝細胞細胞質の好酸性変化が、観察第3日死亡例で軽度の小葉中心性の壊死および空胞変性が、観察第4日死亡例で中等度の小葉中心性壊死が観察された。生存していた1例では、軽度の小葉中心性の肝細胞の肥大が観察された。

【考 察】

DCB 500、1000 および 2000 mg/kg を 5 週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS, SPF] 雄ラットに、DCB 2000 mg/kg を雌ラットに単回強制経口投与し、単回投与における DCB の毒性を検討した。

その結果、雄の 2000 mg/kg 投与群の 3 例がそれぞれ観察第 2、3、4 日に死亡した。同群では、投与当日に自発運動の減少、歩行失調および流涙が全例でみられたほか、横臥位、腹臥位、歩行不能、歩行困難、振戦、呼吸不整、半眼、流涎等の毒性症状が観察された。観察第 2 日にも 3 例では流涎を除くこれらの多くの症状が持続して、その後死に至った。また、雄の 500 mg/kg 投与群では、投与当日、腹臥位、自発運動の減少、半眼、流涎が、1000 mg/kg 投与群ではこれらに加えて体温低下、流涙、閉眼等がみられた。

一方、2000 mg/kg 投与群の生存した雄 2 例では観察第 2 日には自発運動や排便量の減少がみられたもののその後回復し、観察第 5 日以降異常所見は認められなかった。同群の雌でも、雄と同様の所見がみられたものの、その程度はやや弱く、観察第 6 日以降には異常所見は認められなかった。これらのことから、DCB の作用は一過性であり、雌に比較して雄に対して強いものと考えられた。

体重の推移をみると、雄の 500 mg/kg 投与群で体重増加抑制が、1000、2000 mg/kg 投与群ならびに雌の 2000 mg/kg 投与群で体重減少あるいは増加抑制がみられ、投与量の増加に伴ってその程度は強く、増加に転じるまでの期間も長い傾向がみられた。

病理学的には、観察第 3 および 4 日に死亡した 2000 mg/kg 投与群の雄 2 例で肝臓の淡色化がみられ、組織学的には 1 例で軽度の小葉中心性の壊死および空胞変性が、1 例で中等度の小葉中心性壊死が観察された。観察第 2 日の死亡例では肉眼的には変化はみられなかったものの、組織学的には軽度の小葉中心性の肝細胞細胞質の好酸性変化が観察された。観察第 15 日剖検例では、肉眼的には変化はみられなかったが、2000 mg/kg 投与群の雄 1 例で軽度の小葉中心性の肝細胞の肥大が観察された。DCB を 13 週間ラットに経口投与すると小葉中心性の肝細胞壊死や変性がおこることが報告されており⁴⁾、本試験においても同様な変化が生じたことは明らかであった。なお、肝臓傷害によると考えられる一般状態の変化はみられなかった。

また、観察第 3 および 4 日に死亡した同群の雄 2 例では、膀胱内に暗色液の貯留が認められた。上述の DCB の 13 週間投与試験ではポルフィリン尿がみられていることから、本

試験においてみとめられた膀胱内の暗色液もポルフィリンに起因したものと考えられた。

これらのことより、DCB の標的器官は肝臓であり、本試験条件下における DCB の LD₅₀ は、雄では 2000 mg/kg 付近、雌では 2000 mg/kg を上回ると推定された。

【文 献】

- 1) The Merck Index. Tvelefth edition. Merck & Co., Inc. (1996) pp.517
- 2) Ben-Dyke R., Sanderson D.M., Noakes D. N. : Acute toxicity data for pesticides. World review of pest control. 9 : 119-127 (1970)
- 3) Varshavskaya, S.P.; Sanitary-toxicologic characteristics of mono- and di-chlorobenzene and *o*-dichlorobenzene. Gigienicheskaya Otsenka Khimicheskikh Faktorov Veneshniesredy. Moscow (1966) pp.35-37.
- 4) In NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of 1,2-dichlorobenzene (*o*-dichlorobenzene) (CAS NO.95-50-1) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (gavage studies). NTP TR 255 NIH Publication No.86-2511. National Toxicology Program. U.S.A. (1985) pp.11-50.

Table 2-1 Clinical findings in male rats after single oral administration of DCB

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Clinical findings | Hours after administration | | | | | | Days of observation | | | | | | | | |
|-----------------|---------------|---|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | 0~1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10~15 |
| 0 | 1 | Mucous feces | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 2 | Mucous feces | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 3 | No abnormality | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 4 | No abnormality | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 5 | Mucous feces Perianal smudge | - - | + - | - - | + + | - + | - + | - + | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - |
| 500 | 6 | Prone position Incomplete eyelid opening Salivation | - + + | - + - | - + + | - + + | - - - | + - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| | 7 | Decrease in locomotor activity Incomplete eyelid opening Scattering food | - - - | - + - | - + - | - + - | - + - | + + - | - - - | - - + | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - | - - - |
| | 8 | Incomplete eyelid opening Salivation | - - | + - | - + | + - | + - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - |
| | 9 | Incomplete eyelid opening Salivation | - - | + - | + + | + + | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - |
| | 10 | Decrease in locomotor activity Incomplete eyelid opening Mucous feces Perianal smudge Scattering food | - - - - - | - - + - - | - - - + - | - + - + - | - + - + - | + + - + - | - - - + - | - - - + - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |

+, positive; -, negative; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 2-1 (Continued-1)

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Clinical findings | Hours after administration | | | | | | Days of observation | | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------|---|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|-------|
| | | | 0~1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10~15 |
| 1000 | 11 | Incomplete eyelid opening | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Salivation | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in feces volume | | | | | | | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 12 | Incomplete eyelid opening | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Salivation | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in feces volume | | | | | | | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 13 | Prone position | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in locomotor activity | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Lacrimation | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Hypothermia | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Eyelid closure | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Salivation | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Scattering food | | | | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 14 | Decrease in locomotor activity | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Lacrimation | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Incomplete eyelid opening | | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Salivation | | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Decrease in feces volume | | | | | | | | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Scattering food | | | | | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 15 | Lacrimation | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | Incomplete eyelid opening | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | Mucous feces | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | Decrease in feces volume | | | | | | | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |

+, positive; -, negative; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 2-1 (Continued-2)

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Clinical findings | Hours after administration | | | | | | Days of observation | | | | | | | | | | | |
|------------------|---------------|--------------------------------|----------------------------|---|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|-------|---|---|---|
| | | | 0~1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10~15 | | | |
| 2000 | 16 | Prone position | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | | Decrease in locomotor activity | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Ataxic gait | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Lacrimation | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Incomplete eyelid opening | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Perianal smudge | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in feces volume | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 17 | Prone position | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Decrease in locomotor activity | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Ataxic gait | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | No-walking | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Lacrimation | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Incomplete eyelid opening | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Eyelid closure | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Decrease in feces volume | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | |
| | ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 18 | Prone position | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Side position | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Decrease in locomotor activity | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | Ataxic gait | - | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Gait disturbance | | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Tremor | | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Bradypnea | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Hypothermia | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Lacrimation | | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Red tear | | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Rale | | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| D | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 2-1 (Continued-3)

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Clinical findings | Hours after administration | | | | | | Days of observation | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|-------|--|--|---|
| | | | 0~1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10~15 | | | |
| 2000 | 19 | Side position | - | + | + | + | + | + | + | | | | | | | | | | | |
| | | Decrease in locomotor activity | - | + | + | + | + | + | + | | | | | | | | | | | |
| | | Ataxic gait | + | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | |
| | | No-walking | + | + | + | + | + | + | + | | | | | | | | | | | |
| | | Irregular respiration | - | - | - | + | + | + | + | | | | | | | | | | | |
| | | Bradypnea | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | |
| | | Hypothermia | - | + | + | + | + | + | + | | | | | | | | | | | |
| | | Lacrimation | + | + | + | + | + | + | + | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | D |
| | | 20 | Side position | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | |
| | Decrease in locomotor activity | | - | - | - | + | - | - | - | | | | | | | | | | | |
| | Ataxic gait | | + | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | |
| | Irregular respiration | | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | |
| | Lacrimation | | + | + | + | - | - | - | - | | | | | | | | | | | |
| Hypothermia | - | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | |
| | | Incomplete eyelid opening | - | - | + | + | - | - | | | | | | | | | | | | |
| | | Eyelid closure | - | + | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | |
| | | Salivation | - | + | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | |
| | | Decrease in feces volume | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | No-feces | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

Table 2-2 Clinical findings in female rats after single oral administration of DCB

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Clinical findings | Hours after administration | | | | | | Days of observation | | | | | | | | |
|---------------------------|---------------|--------------------------------|----------------------------|---|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|-------|
| | | | 0~1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10~15 |
| 2000 | 21 | Prone position | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in locomotor activity | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Ataxic gait | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Lacrimation | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Incomplete eyelid opening | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Salivation | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Perianal smudge | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in feces volume | | | | | | | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 22 | Decrease in locomotor activity | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Ataxic gait | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Lacrimation | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Incomplete eyelid opening | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Perianal smudge | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in feces volume | | | | | | | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 23 | Prone position | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in locomotor activity | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Lacrimation | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Incomplete eyelid opening | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Salivation | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Perianal smudge | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in feces volume | | | | | | | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | 24 | Prone position | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in locomotor activity | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Ataxic gait | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lacrimation | | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Incomplete eyelid opening | | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Eyelid closure | | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | |
| Decrease in feces volume | | | | | | | | + | + | + | + | - | - | - | - | - | |

+, positive; -, negative; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 2-2 (Continued)

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Clinical findings | Hours after administration | | | | | | Days of observation | | | | | | | | |
|-----------------|---------------|--------------------------------|----------------------------|---|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|-------|
| | | | 0~1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10~15 |
| 2000 | 25 | Prone position | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Crouching position | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in locomotor activity | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Ataxic gait | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Piloerection | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Incomplete eyelid opening | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Eyelid closure | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | No-feces | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | | Decrease in feces volume | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - |

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 3 Body weight changes in male and female rats after single oral administration of DCB

| Sex | Dose (mg/kg) | Animal No. | Days of observation period | | | | | |
|--------|-----------------|---------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | 1 * | 2 | 4 | 8 | 11 | 15 |
| Male | 0 | 1 | 117.8 | 136.0 | 150.0 | 187.1 | 205.5 | 233.1 |
| | | 2 | 126.4 | 147.8 | 173.2 | 214.4 | 252.7 | 294.6 |
| | | 3 | 140.0 | 160.3 | 183.2 | 220.0 | 255.5 | 299.2 |
| | | 4 | 130.4 | 154.4 | 178.2 | 219.3 | 249.5 | 285.1 |
| | | 5 | 132.1 | 151.4 | 176.2 | 215.6 | 241.6 | 286.0 |
| | | Mean | 129.3 | 150.0 | 172.2 | 211.3 | 241.0 | 279.6 |
| | | S. D. | 8.1 | 9.1 | 12.9 | 13.7 | 20.5 | 26.7 |
| | 500 | 6 | 131.4 | 132.4 | 155.2 | 201.6 | 232.7 | 274.4 |
| | | 7 | 133.3 | 139.2 | 163.5 | 207.1 | 236.8 | 277.8 |
| | | 8 | 124.2 | 128.0 | 144.6 | 185.3 | 215.0 | 257.1 |
| | | 9 | 130.5 | 144.4 | 168.5 | 215.5 | 245.1 | 282.4 |
| | | 10 | 124.2 | 129.6 | 147.1 | 190.3 | 217.4 | 255.4 |
| | | Mean | 128.7 | 134.7 | 155.8 | 200.0 | 229.4 | 269.4 |
| | | S. D. | 4.2 | 6.9 | 10.3 | 12.3 | 12.9 | 12.4 |
| | 1000 | 11 | 129.8 | 129.2 | 144.3 | 191.5 | 227.9 | 264.2 |
| 12 | | 131.9 | 124.8 | 144.2 | 192.9 | 225.1 | 264.4 | |
| 13 | | 136.1 | 136.5 | 150.8 | 206.3 | 240.5 | 284.9 | |
| 14 | | 130.7 | 137.5 | 158.6 | 196.8 | 227.6 | 268.2 | |
| 15 | | 119.4 | 124.0 | 142.3 | 183.6 | 218.1 | 254.0 | |
| | Mean | 129.6 | 130.4 | 148.0 | 194.2 | 227.8 | 267.1 | |
| | S. D. | 6.2 | 6.4 | 6.7 | 8.3 | 8.1 | 11.2 | |
| 2000 | 16 | 128.6 | 129.4 | 129.8 | 191.5 | 227.8 | 275.6 | |
| | 17 | 127.9 | 118.8 | 112.2 | 166.5 | 205.5 | 248.6 | |
| | 18 | 139.0 | 129.2 (128.9) [2] | — | — | — | — | |
| | 19 | 129.6 | 122.2 (116.4) [3] | — | — | — | — | |
| | 20 | 118.1 | 107.9 (101.9) [4] | — | — | — | — | |
| | Mean | 128.6 | 121.5 | 121.0 | 179.0 | 216.7 | 262.1 | |
| | S. D. | 7.4 | 8.9 | — | — | — | — | |
| Female | 2000 | 21 | 109.1 | 103.9 | 111.9 | 142.0 | 156.8 | 179.3 |
| | | 22 | 116.4 | 114.5 | 121.6 | 160.8 | 177.0 | 196.0 |
| | | 23 | 108.6 | 101.1 | 105.8 | 134.9 | 152.5 | 169.0 |
| | | 24 | 113.6 | 106.3 | 93.9 | 132.7 | 150.9 | 174.1 |
| | | 25 | 112.8 | 104.2 | 99.2 | 141.6 | 162.7 | 180.7 |
| | Mean | 112.1 | 106.0 | 106.5 | 142.4 | 160.0 | 179.8 | |
| | S. D. | 3.3 | 5.1 | 10.8 | 11.1 | 10.6 | 10.2 | |

*, the day of administration; unit, g; (), body weight at death; [], died day

Table 4 Macroscopic findings in male and female rats after single oral administration of DCB

| Sex | Dose (mg/kg) | Animal No. | Organ | Findings |
|--------|-----------------|------------|-----------------|---------------------------|
| Male | 0 | 1 | General | No abnormality |
| | | 2 | General | No abnormality |
| | | 3 | General | No abnormality |
| | | 4 | General | No abnormality |
| | | 5 | General | No abnormality |
| | 500 | 6 | General | No abnormality |
| | | 7 | General | No abnormality |
| | | 8 | General | No abnormality |
| | | 9 | General | No abnormality |
| | | 10 | General | No abnormality |
| | 1000 | 11 | General | No abnormality |
| | | 12 | General | No abnormality |
| | | 13 | General | No abnormality |
| | | 14 | General | No abnormality |
| | | 15 | General | No abnormality |
| | 2000 | 16 | General | No abnormality |
| | | 17 | General | No abnormality |
| | | 18 (D, 2) | General | No abnormality |
| | | 19 (D, 3) | Liver | Pale |
| | | 20 (D, 4) | Urinary bladder | Accumulation, fluid, dark |
| Female | 2000 | 21 | General | No abnormality |
| | | 22 | General | No abnormality |
| | | 23 | General | No abnormality |
| | | 24 | General | No abnormality |
| | | 25 | General | No abnormality |

(D, number), death and died day.

Table 5 Histopathological findings in male rats after single oral administration of DCB

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Organ | Findings |
|-----------------|------------|-------|--|
| 2000 | 16 | Liver | Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular + |
| | 18 (D, 2) | Liver | Alteration, hepatocyte, cytoplasmic, acidophilic, centrilobular + |
| | 19 (D, 3) | Liver | Necrosis, hepatocyte, centrilobular + Degeneration, hepatocyte, vacuolar, centrilobular + |
| | 20 (D, 4) | Liver | Necrosis, hepatocyte, centrilobular ++ |

+, slight; ++, moderate; (D, number), death and died day.