食薬セ研第１０－１６２２号

２０００年　７月２５日

1-ブロモ-3-クロロプロパ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．病理学検査成績 …… 9
考察 …… 10
文献 …… 11

Tables 1～5

【要　　約】

1-ブロモ-3-クロロプロパン（以下 BCP 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 BCP 500、800、1300 および 2000 mg/kg を、1 群 5 あるいは10匹からなる雌ラットに BCP 800 および 1300 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、雌雄各 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 1300 mg/kg 投与群の 1 例、2000 mg/kg 投与群の 5 例が死亡し、雌では 1300 mg/kg 投与群の全例（10例）が、観察第 2 ～ 5 日に死亡した。

雄の 500 mg/kg 投与群および雌雄の 800 mg/kg 投与群では流涎がみられた。

雄の 1300 mg/kg 投与群では半眼が、2000 mg/kg 投与群では自発運動の減少、腹臥位、半眼、閉眼、歩行失調、流涎等がみられた。雌の 1300 mg/kg 投与群でも、雄の 2000 mg/kg 投与群と同様の変化がみられた。

観察第 2 日に、800 mg/kg 投与群の雌雄では体重増加抑制が、1300 mg/kg 以上の投与群の生存例では体重減少がみられ、生存例ではその後体重は増加したが、800 mg/kg 投与群の雌を除いて観察第15日の体重は対照群の体重には至らなかった。また、死亡例では体重が増加することなく死に至った。

死亡例では、剖検により肺の退縮不全あるいは暗赤色部、脾臓の淡色化がみられ、代表例で実施した組織学検査では全例で肺水腫が観察されたほか、脾臓の白脾髄の萎縮が認められた。

これらのことより、本試験条件下における BCP の LD_{50} は、雄では 1300 mg/kg から 2000 mg/kg の間、雌では 800 mg/kg から 1300 mg/kg の間であると推定された。

【緒　　言】

1-ブロモ-3-クロロプロパン（以下 BCP と略記）は、短鎖ハロゲン化アルカンのひとつで、短鎖ハロゲン化アルカンは抽出溶剤、脱脂混合剤、コポリマー架橋性薬剤、殺虫剤等に使用されている[1)]。BCP のラットにおける単回経口投与時の LD_{50} は 930 mg/kg であることが報告されている[2)]。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、BCP 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。

本試験では、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：A-98-030）の結果に基づいて、片性（雄）について 500、800、1300 および 2000 mg/kg（公比約 1.5）の 4 用量を設定し、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 1300 mg/kg の 1 群を設定して投与を行った（第 1 期）。その結果、雌の全例が死亡したため、雌について 800 および 1300 mg/kg の 2 用量の投与を追加して行った（第 2 期）。

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、1-ブロモ-3-クロロプロパン（以下 BCP と略記）を用いた。本被験物質は、別名を塩化臭素トリメチレンといい、英名は 1-Bromo-3-chloropropane であり、CAS No.109-70-6、分子量 157.44、分子式 C_3H_6BrCl、沸点 143.36℃、蒸気圧 9 mmHg（25℃）の無色透明の液体である。BCP の構造式を以下に示す。

構造式　　$Cl(CH_2)_3Br$

本試験には、　　より提供された BCP（ロット番号：　　純度：99.9 area %）を用いた。受領した被験物質は、使用時まで被験物質保管室にて、遮光して室温で保管した。

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25匹雌20匹（第 1 期 5 匹、第 2 期15匹）を用いた。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 5 群に分けた。雌は、第 1 期入荷動物については動物番号の若い方から 5 匹を使用し、第 2 期入荷動物について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 3 群に分けた。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±1℃、基準湿度50～65%、換気回数約15回／時、照明12時間（7 時～19 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

（注）

	第 1 期	第 2 期
動物入荷日	1999年 2 月 3 日	1999年 2 月24日
入荷時匹数	雄28匹、雌 6 匹	雌17匹
入荷時体重	雄 80.2～90.1 g、雌 85.0～90.3 g	雌 74.6～82.1 g
投　与　日	1999年 2 月10日	1999年 3 月 3 日
投与時体重	雄 120.8～134.0 g、雌 113.6～122.7 g	雌 106.9～116.2 g

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 23.5～25.0℃、51.0～67.5%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にあった。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、各動物の尾に油性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、各用量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、投与時まで遮光して室温で保存し、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（C-98-009）において本被験物質の 0.4 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、第1期および第2期とも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、C）。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、ガスクロマトグラフ法により測定した（Appendix D）。

4．投与量の設定および投与方法

第1期における投与量は、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：A-98-030）の結果に基づいて決定した。すなわち、予備試験において 500 mg/kg 投与群で体重増加抑制がみられ、2000 mg/kg の投与で雌雄全例が死亡したため、本試験では毒性作用と致死量を検討する目的で、片性（雄）について 500、800、1300 および 2000 mg/kg（公比約 1.5）の4用量を設定し、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 1300 mg/kg の1群を設定して投与を行った（第1期）。

その結果、雌の全例が死亡したため、雌について 800 および 1300 mg/kg の2用量の投与を追加した（第2期）。

また、媒体対照群として、雌雄各5匹にコーン油を 10 mL/kg 投与した（雄：第1期、雌：第2期）。

投与容量は体重1kg当たり 10 mL とし、動物を約18時間絶食させた後、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9時43分～10時01分（第1期）、午前9時58分～10時08分（第2期）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	動物番号 雌
コーン油	0	0	10	1～5*	31～35**
BCP	500	5	10	6～10*	
BCP	800	8	10	11～15*	36～40**
BCP	1300	13	10	16～20*	26～30* 41～45**
BCP	2000	20	10	21～25*	

*：第1期、**：第2期

5．観察および検査

第1期および第2期とも、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、第1期の 2000 mg/kg 投与群の雄2例（動物番号：21、22）および 1300 mg/kg 投与群の雌1例（動物番号：26）について心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および胃を、1300 mg/kg 投与群の雌1例（動物番号：28）についてこれらの器官に加えて副腎を 0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。また、第2期の 800 mg/kg 投与群の1例（動物番号：36）および 1300 mg/kg 投与

群の1例（動物番号：43）の心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および胃を同様に固定した。

固定した器官のうち、2000 mg/kg 投与群の雄1例（動物番号：21）の肺、同群の他の雄1例（動物番号：22）の肺および脾臓、1300 mg/kg 投与群の雌1例（動物番号：26）の肺、脾臓および胃、同群の他の雌1例（動物番号：28）の肺、脾臓および副腎について組織検査を実施した。すなわち、これらの器官を固定後、パラフィン包埋後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。なお、雌雄ともに LD_{50} は算出しなかった。

【結　　果】

1．死亡動物（Table 1）

雄において、500 および 800 mg/kg 投与群では死亡例はなかった。1300 mg/kg 投与群では観察第 2 日に 1 例が死亡して発見された。2000 mg/kg 投与群では 4 例が観察第 2 日に、1 例が観察第 3 日にいずれも死亡した。

雌において、第 1 期には 1300 mg/kg 投与群で観察第 2 および 3 日に各 2 例が、観察第 5 日に 1 例がいずれも死亡した。第 2 期には、800 mg/kg 投与群では死亡例はみられなかったが、1300 mg/kg 投与群では観察第 2 日に 2 例が、観察第 3 日に残る 3 例が死亡した。

2．一般状態（Table 2-1～2-2）

雄において、対照群では粘液便あるいは下痢が 3 例で投与後約 1 時間以降約 5 時間までに観察された。500 mg/kg 投与群では、流涎が 1 例で投与後約 1 時間までに、他の 1 例で投与後 1 ～ 2 時間の間にみられた。また、粘液便あるいは下痢が 2 例で投与後から約 3 時間後にみられた。800 mg/kg 投与群では流涎が 1 例で投与後約 1 ～ 2 時間にみられたのみであった。

雄の 1300 mg/kg 投与群では、流涎が 1 例で投与後約13分から約 3 時間までみられた。他の 1 例では、投与後約 4 時間に流涙が、投与後約 6 時間に半眼が観察され、観察第 2 日に死亡した。他の 3 例では、異常所見は認められなかった。

雄の 2000 mg/kg 投与群では、流涎が 3 例で投与後 1 時間以内に、他の 1 例で投与後約 1 時間以降にみられた。その後流涎は、投与後 1 時間以内に流涎が発現した 1 例では比較的速やかに消失したが、他の 3 例では約 3 時間あるいは 5 時間持続して観察された。また、自発運動の減少が 1 例では投与後約 1 時間以内に発現し、一旦回復したものの投与後約 6 時間に腹臥位および閉眼とともに再び観察された。他の 2 例では投与後約 6 時間に自発運動が減少し、それに先立ってあるいはほぼ同時に半眼あるいは閉眼がみられた。自発運動の減少がみられた 3 例では、歩行失調も観察され、そのうちの 2 例では四肢および尾の赤色化が投与後約 4 ～ 6 時間にみられた。他の 1 例では自発運動の減少はみられなかったが、投与後約 2 ～ 3 時間に流涙が観察され、投与後約 3 時間以降には半眼が観察された。観察第 2 日には、投与日に異常所見が観察された例のうちの 3 例および投与日には異常所見が

みられなかった1例が死亡した。生存していた1例では半眼がみられ、観察第3日に死亡した。

雌において、第2期の対照群では粘液便が3例で投与後約1時間以内から約3時間までに観察され、このうちの1例では肛門周囲の汚れも認められた。800 mg/kg 投与群では、流涎が4例で投与後約1時間以内に観察されたが、全例とも比較的速やかに消失した。また、流涙が1例で投与後約2時間に、軟便が他の1例で投与後約6時間にみられた。

第1期の雌の 1300 mg/kg 投与群では、流涎が4例で投与後速やかにみられ、1例では投与後1時間以内に、2例では投与後約2～3時間には消失したが、1例では投与後6時間まで断続的にみられた。また、流涙が3例で投与後約2～4時間にみられた。その他、1例では四肢および尾の赤色化が投与後約6時間にみられた。観察第2日には、2例が死亡した。生存していた3例では自発運動および排便量の減少がみられたほか、緩徐呼吸および体温低下が2例で認められ、この2例は観察第3日に死亡した。残る1例は、観察第3日には横臥位で排便および排尿はみられず、観察第4日も同様の所見のほか振戦がみられ、観察第5日に死亡した。

第2期の雌の 1300 mg/kg 投与群では、投与後約1時間以内に全例で自発運動の減少、半眼および閉眼が、4例で腹臥位がみられたが、投与後2時間には回復した。また、流涎が4例で投与後1時間以内から約4時間の間に、流涙が2例で投与後2時間以降にみられ、1例では投与後6時間まで持続した。その他、投与日に1例で餌こぼしが、1例で粘液便および肛門周囲の汚れがいずれも投与後約6時間にみられた。観察第2日には、2例が死亡し、生存例のうちの2例は腹臥位で排便および排尿はみられず、そのうちの1例で呼吸不整が観察された。観察第3日に3例とも死亡した。

3．体重推移（Table 3-1～3-2）

雄において、対照群および 500 mg/kg 投与群では、観察期間中順調な体重増加がみられた。800 mg/kg 投与群では観察第2日に体重増加抑制が、1300 mg/kg 投与群の生存していた4例では観察第2日に体重減少あるいは体重増加抑制がみられ、これらの群ではその後体重は増加したものの、観察第15日の体重は対照群の体重には至らなかった。2000 mg/kg 投与群の観察第3日に死亡した1例では、観察第2日にはほとんど体重は増加しなかった。

雌において、対照群では、観察期間中順調な体重増加がみられた。800 mg/kg 投与群で

は、観察第2日に4例で体重増加抑制がみられたが、その後順調に体重は増加し、観察第4日には対照群と同程度の体重値となった。第1期の 1300 mg/kg 投与群では、観察第2日に生存していた3例全例で体重が減少し、観察第4日に生存していた1例ではさらに体重が減少した。第2期の 1300 mg/kg 投与群では、観察第2日の生存例3例で体重が減少あるいはほとんど増加がみられなかった。

4．病理学検査成績（Table 4-1～4-2、5）

雄の対照群、500 および 800 mg/kg 投与群において、観察第15日に実施した剖検では、全例の器官・組織に異常所見は認められなかった。

雄の 1300 mg/kg 投与群の死亡した1例では、肺に退縮不全および暗赤色部がみられた。2000 mg/kg 投与群の観察第2日に死亡した4例中3例でも、肺に暗赤色部がみられたほか、2例では肺の退縮不全がみられた。同群の観察第3日に死亡した1例でも、肺に暗赤色部、脾臓の淡色化がみられた。なお、1例では特記すべき変化は認められなかった。

雌の対照群および 800 mg/kg 投与群において、観察第15日に実施した剖検では、全例の器官・組織に異常所見は認められなかった。

第1期の雌の 1300 mg/kg 投与群では全5例が死亡したが、4例で肺に暗赤色部がみられたほか、これらのうちの3例で脾臓の淡色化が、1例で胸水および腺胃粘膜の暗色点が、1例で副腎の肥大が観察された。なお、1例では特記すべき変化は認められなかった。

第2期の雌の 1300 mg/kg 投与群でも全例が死亡し、2例で腺胃粘膜の淡色化がみられ、そのうちの1例で肺の退縮不全がみられたほか、他の2例で脾臓の小型化および淡色化がみられた。1例では特記すべき変化は認められなかった。

雄および第1期の雌の死亡例のうち、代表例4例について組織学検査を実施した結果、全例で肺に水腫がみられた。その程度は、2000 mg/kg 投与群の雄2例および 1300 mg/kg 投与群の雌1例では軽度、1300 mg/kg 投与群の他の雌1例では強度であった。これらの雄の例では肺に軽微な泡沫細胞浸潤も観察され、1300 mg/kg 投与群の雌1例でも肺に軽度な泡沫細胞浸潤が観察された。また、2000 mg/kg 投与群の雄1例および 1300 mg/kg 投与群の雌2例では脾臓に白脾髄の中等度の萎縮がみられたほか、1300 mg/kg 投与群の雌1例では副腎の束状帯に軽度の空胞化がみられた。

【考　　察】

BCP 500、800、1300 および 2000 mg/kg を 5 週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD (SD)IGS,SPF] 雄ラットに、BCP 800 および 1300 mg/kg を同週齢同系統の雌ラットに単回強制経口投与して単回投与時の BCP の毒性を検討した。

その結果、500 および 800 mg/kg 投与群では流涎がみられた程度であったが、1300 mg/kg 以上の投与群では死亡例がみられた。雄では、1300 mg/kg 投与群の 1 例で投与日に半眼が見られた後投与翌日に死亡し、2000 mg/kg 投与群では自発運動の減少、腹臥位、半眼、閉眼、歩行失調、流涎等がみられて、投与翌日あるいは翌々日に全例が死亡した。死亡例では、剖検により肺の退縮不全あるいは暗赤色部、脾臓の淡色化がみられ、代表例で実施した組織学検査では全例で肺水腫が観察されたほか、脾臓の白脾髄の萎縮が認められたことから、肺の変化が死因につながったものと考えられた。

雌では、第 1 期および第 2 期のいずれも 1300 mg/kg 投与群の全例が死亡した。一般状態および病理解剖所見では、雄の 2000 mg/kg 投与群と同様の変化が認められたほか、観察第 2 日以降に死亡した例では緩徐呼吸や呼吸不整が観察されたことから、死因は雄と同様と推察された。

観察第 2 日に、800 mg/kg 投与群の雌雄では体重増加抑制が、1300 mg/kg 以上の投与群の生存例では体重減少がみられ、生存例ではその後体重は増加したが、800 mg/kg 投与群の雌を除いて観察第15日の体重は対照群の体重には至らなかった。また、死亡例では体重が増加することなく死に至った。

これらのことから、BCP の投与により流涎が起き、1300 mg/kg 以上の投与により、一般状態の悪化、脾臓の萎縮、肺水腫が生じたものと考えられ、また、その影響は雄に比較して雌で大きいものと推察された。

なお、雌雄の対照群、雄の 500 mg/kg 投与群および雌の 800 mg/kg 投与群で観察された下痢、粘液便あるいは軟便は、媒体であるコーン油によるものと考えられた。

これらのことより、本試験条件下における BCP の LD_{50} は、雄では 1300 mg/kg から 2000 mg/kg の間、雌では 800 mg/kg から 1300 mg/kg の間であると推定された。

【文　　献】

1) Lag M., S r derlund E.J., Omichinski J.G., Brunborg G., Holme J.A., Dahl J. E., Nelson S.D., Dybing E. : Effect of bromine and chlorine positioning in the induction of renal and testicular toxicity by halogenated propanes. Chem. Res. Toxicol. 4. 528-534 (1991)

2) ЗЙТИНГОН А. И.: ХАРАКТЕИСИКА ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО, ГОНАДОТРОПНОГО И МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ 1,3-ХЛОРБРОМПРОПАНА. Toksikologiya Novykh Promyshlennykh Khimicheskikh Veshchestv. 12. 93-100 (1971)

Table 1 Mortality of rats after single oral administration of BCP

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Hours after administration						Days of observation														Total
			0～1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Male	0 (1)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0／5
	500 (1)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0／5
	800 (1)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0／5
	1300 (1)	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1／5
	2000 (1)	5	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5／5
Female	0 (2)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0／5
	800 (2)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0／5
	1300 (1)	5	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5／5
	1300 (2)	5	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5／5

The first day, the day of administration.
(1), the first stage of administration; (2), the second stage of administration

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

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	No abnormality															
	2	Mucous feces	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	3	Diarrhea	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Mucous feces	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	4	Diarrhea	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Mucous feces	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	5	No abnormality															
500	6	Salivation	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	7	No abnormality															
	8	No abnormality															
	9	Diarrhea	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Mucous feces	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	10	Salivation	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Mucous feces	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
800	11	Salivation	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	12	No abnormality															
	13	No abnormality															
	14	No abnormality															
	15	No abnormality															

+, 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
1300	16	Salivation	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	17	Incomplete eyelid opening	−	−	−	−	−	+	D								
		Lacrimation	−	−	−	+	−	−									
	18	No abnormality															
	19	No abnormality															
	20	No abnormality															

+, positive; −, negative; D, death; 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	21	Prone position	−	−	−	−	−	+									
		Decrease in locomotor activity	+	−	−	−	−	+									
		Ataxic gait	−	−	−	−	+	−									
		Lacrimation	−	+	+	+	+	+									
		Eyelid closure	−	−	−	−	−	+									
		Salivation	+	+	+	−	−	−									
		Reddish limbs and tail	−	−	−	+	+	+									
									D								
	22	Lacrimation	−	+	+	−	−	−	−								
		Incomplete eyelid opening	−	−	−	+	+	+	+								
		Salivation	+	+	+	−	−	−	−								
										D							
	23	Decrease in locomotor activity	−	−	−	−	−	+									
		Ataxic gait	−	−	−	−	−	+									
		Incomplete eyelid opening	−	−	−	−	+	+									
		Salivation	+	−	−	−	−	−									
		Reddish limbs and tail	−	−	−	−	−	+									
									D								
	24	Decrease in locomotor activity	−	−	−	−	−	+									
		Ataxic gait	−	−	−	+	+	−									
		Incomplete eyelid opening	−	−	−	−	+	−									
		Eyelid closure	−	−	−	−	−	+									
		Salivation	−	+	+	+	+	+									
									D								
	25								D								

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

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

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 (2)	31	No abnormality															
	32	Mucous feces	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Perianal smudge	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	33	Mucous feces	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	34	No abnormality															
	35	Mucous feces	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
800 (2)	36	Salivation	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	37	Lacrimation	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Salivation	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	38	Salivation	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Soft feces	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	39	No abnormality															
	40	Salivation	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

(1), the first stage of administration; (2), the second stage of administration (continued)
+, positive; −, negative; The first day, the day of administration.

Table 2-2 (Continued-1)

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration 0～1	2	3	4	5	6	Days of observation 2	3	4	5	6	7	8	9	10～15
1300 (1)	26	Lacrimation	−	−	+	−	−	−									
		Salivation	+	+	+	+	−	+									
		Reddish limbs and tail	−	−	−	−	−	+									
									D								
	27	Lacrimation	−	−	+	−	−	−									
		Salivation	+	−	−	−	−	−									
									D								
	28	Side position	−	−	−	−	−	−	−	+	+						
		Decrease in locomotor activity	−	−	−	−	−	−	+	−	−						
		Tremor	−	−	−	−	−	−	−	−	+						
		Lacrimation	−	+	−	−	−	−	−	−	−						
		Salivation	+	+	+	−	−	−	−	−	−						
		Decrease in feces volume	−	−	−	−	−	−	+	−	−						
		No-feces and no-urine	−	−	−	−	−	−	−	+	+						
												D					
	29	Decrease in locomotor activity	−	−	−	−	−	−	+								
		Decrease in feces volume	−	−	−	−	−	−	+								
		Bradypnea	−	−	−	−	−	−	+								
		Hypothermia	−	−	−	−	−	−	+								
										D							
	30	Decrease in locomotor activity	−	−	−	−	−	−	+								
		Bradypnea	−	−	−	−	−	−	+								
		Hypothermia	−	−	−	−	−	−	+								
		Salivation	+	+	−	−	−	−	−								
		Decrease in feces volume	−	−	−	−	−	−	+								
										D							

(1), the first stage of administration; (2), the second stage of administration (continued)
+, positive; −, negative; D, death; The first day, the day of administration.

Table 2-2 (Continued-2)

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration 0～1	2	3	4	5	6	Days of observation 2	3	4	5	6	7	8	9	10～15
1300 (2)	41	Prone position	+	−	−	−	−	−									
		Decrease in locomotor activity	+	−	−	−	−	−									
		Incomplete eyelid opening	+	−	−	−	−	−									
		Eyelid closure	+	−	−	−	−	−									
		Salivation	+	−	−	−	−	−									
		Scattering food	−	−	−	−	−	+									
									D								
	42	Prone position	+	−	−	−	−	−	−								
		Decrease in locomotor activity	+	−	−	−	−	−	−								
		Incomplete eyelid opening	+	−	−	−	−	−	−								
		Eyelid closure	+	−	−	−	−	−	−								
										D							
	43	Decrease in locomotor activity	+	−	−	−	−	−									
		Incomplete eyelid opening	+	−	−	−	−	−									
		Eyelid closure	+	−	−	−	−	−									
		Lacrimation	−	+	−	−	+	+									
		Salivation	+	−	+	+	−	−									
									D								
	44	Prone position	+	−	−	−	−	−	+								
		Decrease in locomotor activity	+	−	−	−	−	−	−								
		Incomplete eyelid opening	+	−	−	−	−	−	−								
		Eyelid closure	+	−	−	−	−	−	−								
		Lacrimation	−	−	+	+	+	+	+								
		Salivation	−	+	−	−	−	−	−								
		No-feces and no-urine	−	−	−	−	−	−	+								
										D							

(1), the first stage of administration; (2), the second stage of administration (continued)
+, positive; −, negative; D, death; The first day, the day of administration.

Table 2-2 (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
1300 (2)	45	Prone position	+	−	−	−	−	−	+								
		Decrease in locomotor activity	+	−	−	−	−	−	−								
		Incomplete eyelid opening	+	−	−	−	−	−	−								
		Eyelid closure	+	−	−	−	−	−	−								
		Salivation	+	+	−	−	−	−	−								
		Mucous feces	−	−	−	−	−	+	−								
		Perianal smudge	−	−	−	−	−	+	−								
		Irregular respiration	−	−	−	−	−	−	+								
		No-feces and no-urine	−	−	−	−	−	−	+								
										D							

(1), the first stage of administration; (2), the second stage of administration
+, positive; −, negative; D, death; The first day, the day of administration.

Table 3-1 Body weight changes in male rats after single oral administration of BCP

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation period 1 *	2	4	8	11	15
0	1	123.1	142.0	162.7	194.9	211.8	252.0
	2	130.1	156.1	174.3	208.3	229.3	270.1
	3	124.8	144.4	168.9	200.7	221.2	258.8
	4	124.0	147.4	170.7	207.5	228.0	265.5
	5	130.8	156.1	184.4	221.2	242.4	285.4
	Mean	126.6	149.2	172.2	206.5	226.5	266.4
	S.D.	3.6	6.6	8.0	9.9	11.3	12.7
500	6	130.1	144.0	164.6	197.8	212.9	244.2
	7	125.2	145.6	169.0	208.3	230.6	267.7
	8	130.1	151.5	170.9	209.4	229.9	270.8
	9	133.3	150.4	174.1	221.8	246.0	297.4
	10	133.5	152.5	169.5	205.0	221.1	255.5
	Mean	130.4	148.8	169.6	208.5	228.1	267.1
	S.D.	3.4	3.8	3.4	8.7	12.3	19.9
800	11	120.8	131.0	158.6	187.0	208.7	239.5
	12	126.9	139.1	163.8	194.8	214.8	247.6
	13	129.9	147.7	165.8	205.1	223.5	262.9
	14	132.5	143.1	170.2	216.3	241.5	287.2
	15	125.8	133.6	156.3	194.9	213.2	255.5
	Mean	127.2	138.9	162.9	199.6	220.3	258.5
	S.D.	4.4	6.8	5.6	11.3	13.0	18.2
1300	16	121.7	125.9	148.7	184.0	199.3	237.8
	17	131.8	(119.0)[2]	—	—	—	—
	18	134.0	129.2	153.3	194.1	223.4	265.0
	19	123.8	128.0	145.7	181.7	201.4	235.8
	20	130.9	124.1	155.9	197.4	220.4	262.3
	Mean	128.4	126.8	150.9	189.3	211.1	250.2
	S.D.	5.4	2.3	4.6	7.6	12.5	15.6
2000	21	128.3	(120.4)[2]	—	—	—	—
	22	123.7	125.1 (114.7)[3]	—	—	—	—
	23	124.4	(115.3)[2]	—	—	—	—
	24	131.3	(120.8)[2]	—	—	—	—
	25	130.8	(125.1)[2]	—	—	—	—
	Mean	127.7	125.1				
	S.D.	3.5					

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

Table 3-2 Body weight changes in female rats after single oral administration of BCP

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation period 1 *	2	4	8	11	15
0 (2)	31	113.5	133.6	146.3	176.1	179.5	204.4
	32	115.2	128.3	145.1	166.3	170.8	186.0
	33	108.9	128.0	140.9	162.4	167.9	187.4
	34	111.1	130.4	140.0	164.0	168.4	186.4
	35	111.6	133.3	144.5	168.6	173.9	194.3
	Mean	112.1	130.7	143.4	167.5	172.1	191.7
	S.D.	2.4	2.7	2.8	5.4	4.8	7.9
800 (2)	36	115.0	124.4	146.1	179.0	185.7	211.4
	37	109.0	126.9	147.3	178.3	185.8	202.7
	38	106.9	110.0	130.5	154.9	162.1	180.0
	39	107.8	114.6	138.9	167.7	175.2	202.7
	40	112.4	116.8	136.6	154.6	161.1	176.4
	Mean	110.2	118.5	139.9	166.9	174.0	194.6
	S.D.	3.4	7.0	7.0	12.0	12.1	15.5
1300 (1)	26	113.6	101.5	(100.3)[2] —	—	—	—
	27	117.9	115.1	(112.4)[2] —	—	—	—
	28	122.7	114.2	108.1	(104.3)[5] —	—	—
	29	116.2	108.6	(106.1)[3] —	—	—	—
	30	114.6	111.1	(106.6)[3] —	—	—	—
	Mean	117.0	110.1	108.1			
	S.D.	3.6	5.5				
1300 (2)	41	109.5	(94.2)[2]	—	—	—	—
	42	114.7	116.8	(108.5)[3] —	—	—	—
	43	111.7	(110.6)[2]	—	—	—	—
	44	106.9	94.2	(92.2)[3] —	—	—	—
	45	116.2	110.6	(105.1)[3] —	—	—	—
	Mean	111.8	107.2				
	S.D.	3.8	11.7				

(1), the first stage of administration; (2), the second stage of administration.
*, the day of administration; unit, g ; ( ), body weight at death; [ ], died day

Table 4-1 Macroscopic findings in male rats after single oral administration of BCP

Dose (mg/kg)	Animal No.	Organ	Findings
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
800	11	General	No abnormality
	12	General	No abnormality
	13	General	No abnormality
	14	General	No abnormality
	15	General	No abnormality
1300	16	General	No abnormality
	17 (D, 2)	Lung	Insufficiency, retraction Area, dark red
	18	General	No abnormality
	19	General	No abnormality
	20	General	No abnormality
2000	21 (D, 2)	Lung	Area, dark red
	22 (D, 3)	Lung	Area, dark red
		Spleen	Pale
	23 (D, 2)	General	No abnormality
	24 (D, 2)	Lung	Insufficiency, retraction Area, dark red
	25 (D, 2)	Lung	Insufficiency, retraction Area, dark red

(D, number), death and died day.

Table 4-2 Macroscopic findings in female rats after single oral administration of BCP

Dose (mg/kg)	Animal No.	Organ	Findings
0 (2)	31	General	No abnormality
	32	General	No abnormality
	33	General	No abnormality
	34	General	No abnormality
	35	General	No abnormality
800 (2)	36	General	No abnormality
	37	General	No abnormality
	38	General	No abnormality
	39	General	No abnormality
	40	General	No abnormality
1300 (1)	26 (D, 2)	Lung	Area, dark red
		Spleen	Pale
		Glandular stomach	Spot, dark, mucosa
		Thoracic cavity	Hydrothorax
	27 (D, 2)	General	No abnormality
	28 (D, 5)	Lung	Area, dark red
		Spleen	Pale
		Adrenal gland	Enlargement
	29 (D, 3)	Lung	Area, dark red
		Spleen	Pale
	30 (D, 3)	Lung	Area, dark red
1300 (2)	41 (D, 2)	Lung	Insufficiency, retraction
		Glandular stomach	Area, pale, mucosa
	42 (D, 3)	Spleen	Small, pale
	43 (D, 2)	Glandular stomach	Area, pale, mucosa
	44 (D, 3)	Spleen	Small, pale
	45 (D, 3)	General	No abnormality

(1), the first stage of administration; (2), the second stage of administration
(D, number), death and died day.

Table 5 Histopathological findings in male and female rats after single oral administration of BCP

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Organ	Findings
Male	2000	21 (D, 2)	Lung	Edema +
		22 (D, 3)	Lung	Edema +; Cellular infiltration, foam cell ±
			Spleen	Atrophy, white pulp ++
Female	1300	26 (D, 2)	Lung	Edema +++
			Spleen	Atrophy, white pulp ++
			Stomach	No abnormality
		28 (D, 5)	Lung	Edema +; Cellular infiltration, foam cell +
			Spleen	Atrophy, white pulp ++
			Adrenal gland	Vacuolization, zona fasciculata +

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