

最終報告書

表 題：2-クロロハイドロキノンジメチルエーテルのラットにおける 28 日間反復経口投与
毒性試験

試験番号：S R 0 6 1 1 2

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙-----	1
目次-----	5
要約-----	12
緒言-----	13
材料および方法-----	13
成績-----	26
考察-----	34
参考資料-----	38

Figures

1	Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	40
2	Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	41
3	Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	42
4	Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	43

Tables

1	General appearance of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	44
2	General appearance of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	45
3	Detailed clinical observation, in the cage, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	46

4	Detailed clinical observation, on the hand, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	47
5	Detailed clinical observation, in the open-field, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	48
6	Detailed clinical observation, in the cage, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	49
7	Detailed clinical observation, on the hand, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	50
8	Detailed clinical observation, in the open-field, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	51
9	Functional observation of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	52
10	Functional observation of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	53
11	Grip strength and motor activity measurements of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	54
12	Grip strength and motor activity measurements of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	55
13	Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	56
14	Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	57
15	Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	58
16	Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	59
17	Urinary findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	60
18	Urinary findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	61
19	Urinary findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	62
20	Urinary findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	63
21	Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	64

22	Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	65
23	Hematological findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	66
24	Hematological findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	67
25	Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	68
26	Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	69
27	Biochemical findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	70
28	Biochemical findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	71
29	Gross findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	72
30	Gross findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	73
31	Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	74
32	Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	75
33	Absolute and relative organ weights of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	76
34	Absolute and relative organ weights of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	77
35	Histopathological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) -----	78
36	Histopathological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112) --	79

要 約

2-クロロハイドロキノンジメチルエーテルの0(対照、トウモロコシ油)、40、200および1000 mg/kgを1群雄雌各6匹のCr1:CD(SD)ラットに、28日間反復経口投与して毒性発現の有無およびその概要を検討した。さらに、0および1000 mg/kgについて1群雄雌各6匹の回復群を設け、投与終了の翌日から14日間観察を継続し休薬による毒性の回復性を併せて検討し、以下の成績を得た。

1. 一般状態では、1000 mg/kg 投与群の雄2例および雌1例に投与3日によるめき歩行が認められた。
2. 体重推移では、1000 mg/kg 投与群の雄に体重増加抑制が認められた。
3. 尿検査では、1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに有意差を伴うpHおよび蛋白の低下ならびに尿量の増加、雌に尿比重の有意な低下が認められた。
4. 血液学的検査では、1000 mg/kg 投与群の雌に網赤血球数の有意な高値および活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。
5. 血液化学的検査では、200 mg/kg 投与群では雄に α_2 グロブリン分画比およびALTの高値、雌にアルブミンおよび総コレステロールの高値が認められた。
1000 mg/kg 投与群では雄雌ともに総蛋白、ALT、 γ -GTP、総コレステロールおよびカルシウムの高値、蛋白分画における α_2 グロブリンの有意な高値が認められた。
6. 剖検所見では、1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに肝臓の暗褐色化および肥大が認められた。
7. 器官重量では、200 mg/kg 投与群の雄雌ともに肝臓の相対重量の有意な高値、1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに肝臓の絶対および相対重量の有意な高値、雄の腎臓に相対重量の有意な高値が認められた。
8. 病理組織学的検査では、1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、雄に腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴および好酸性小体(α_2 -グロブリン染色陽性)が認められた。
9. 投与期間終了時に認められた変化には、いずれも回復性が認められた。
10. 詳細な一般状態観察、機能検査および摂餌量では、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下における2-クロロハイドロキノンジメチルエーテルの無影響量(NOEL)は雄雌ともに40 mg/kg/dayと考えられた。

緒 言

2-クロロハイドロキノンジメチルエーテルの0(対照、トウモロコシ油)、40、200および1000 mg/kgを1群雄雌各6匹のCr1:CD(SD)ラットに、28日間反復経口投与して毒性発現の有無およびその概要を検討した。さらに、0および1000 mg/kgについて1群雄雌各6匹の回復群を設け、投与終了の翌日から14日間観察を継続し休薬による毒性の回復性を併せて検討した。

材料および方法

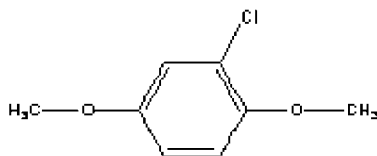
1. 被験物質

被験物質は、2-クロロハイドロキノンジメチルエーテル[純度：99.2% (Appendix 1-1)、]を500 g購入して、使用した。受入後は、容器は密栓して冷暗所(実測範囲1～8℃)に保管した。

被験物質サンプルとして、約1 gを採取し、試験施設の資料保存室に保存した。試験操作終了後、残余の被験物質の一部を使用して純度の分析を行い、試験期間中の保存安定性を確認し(Appendix 1-2)、他は焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

被験物質の特性情報を以下に示す。

名称	: 2-クロロハイドロキノンジメチルエーテル
別名	: 1-クロロ-2,5-ジメトキシベンゼン ; Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy ¹⁾ 2,5-ジメトキシクロロベンゼン ; 2,5-Dimethoxychlorobenzene ²⁾
CAS No.	: 2100-42-7
化審法官報公示整理番号	: (3)-918
示性式(構造式)	: $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}$ ²⁾



分子式	: $\text{C}_8\text{H}_9\text{ClO}_2$ ¹⁾
分子量	: 172.61 (分子式より算出)

物理化学的性質 : 外観 ; 透明な無色の液体²⁾
 融点 ; 8.1℃¹⁾
 沸点 ; 247℃¹⁾
 比重 ; 1.23g/cm³¹⁾
 蒸気圧 ; 0.108mmHg¹⁾
 LogPOW ; 2.69¹⁾
 溶解性 ; 対水溶解度 301 mg/L¹⁾、水に不溶²⁾

2. 媒体

被験物質の調製媒体は、トウモロコシ油(ロット番号 V6R2129、ナカライテスク株式会社)を使用し、また、対照群の投与液としても使用した。

3. 投与液の調製および化学分析

(1) 投与液の調製

被験物質を精秤し、所定の濃度となるように媒体を添加後、溶解させた。

被験物質はドラフト内で取扱い、調製の際にはマスク、手袋等を着用し、吸入、眼、皮膚および衣類等との接触を避けた。調製液は、スターラーにて均一にしてバイアル瓶に分注後、室温保存(実測範囲 22～24℃)し、調製後 9 日以内に投与に用いた。残余の投与液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

調製日	調製濃度 (mg/mL)	被験物質秤量値 (g)	投与液調製量 (mL)
2007 年 4 月 9 日 濃度確認実施	4	0.6002	150
	20	3.0016	150
	100	22.0037	220
2007 年 4 月 13 日	4	0.8400	210
	20	4.2002	210
	100	31.0004	310
2007 年 4 月 20 日	4	1.0407	260
	20	5.2008	260
	100	40.0014	400
2007 年 4 月 27 日	4	1.1202	280
	20	5.6005	280
	100	42.0008	420
2007 年 5 月 1 日 濃度確認実施	4	0.8003	200
	20	4.0000	200
	100	30.0001	300

(2) 投与液の化学分析

投与開始前に、被験物質の最低濃度および最高濃度に関する投与液中における均一性および安定性を確認した。

4 および 100 mg/mL の被験物質調製液について、均一性ならびに室温保存 9 日間(調製日を 0 日として起算)の安定性を確認した結果、4 および 100 mg/mL の調製液中で、上層・中層・下層における変動係数はそれぞれ 0.6 および 1.5% であり、また、残存率は室温保存 9 日間で 99.0 および 100.0% であった。この成績から、被験物質は調製液中で均一であり、かつ室温保存で 9 日間は安定であると判断した(Appendix 2-1 および 2-2)。

初回および最終回調製時のすべての投与液について、被験物質の濃度を分析した結果、4、20 および 100 mg/mL 調製液の含有率は、所定の濃度に対して初回調製時で 107.3、107.5 および 110.0%、最終回調製時で 104.8、103.5 および 104.0% であった。これらの投与液はいずれも規定範囲とした 90~110% の範囲内にあり、かつ変動係数も 0.5~1.6% で規定の 5% 以下であったことから、調製液の濃度は適正と判断した(Appendix 2-3 および 2-4)。

(3) 濃度分析方法

標準物質として、被験物質を用いた。

標準溶液(約 50 μ g/mL)：2-クロロハイドロキノンジメチルエーテルの 16 μ L を採取し、重量を測定後、20 mL 容メスフラスコに入れた。テトラヒドロフランで定容し、約 1000 μ g/mL 溶液を調製した(標準原液)。標準原液の 1 mL を正確に 20 mL 容のメスフラスコに採取し、テトラヒドロフランで定容して約 50 μ g/mL 溶液とした(標準溶液)。標準溶液の調製は 1 回、HPLC への注入は 3 回とした。標準溶液は用時に調製して当日中に使用した。

移動相：蒸留水 400 mL にアセトニトリル 450 mL およびテトラヒドロフラン 150 mL を加え、十分に混合した。この液 1000 mL にトリエチルアミンおよび酢酸を各 1 mL 加え、十分に混合したものを移動相とした。調製後は室温で保存し、13 日間以内に使用した(調製日を 0 日として起算)。

オートサンブラ洗浄液：蒸留水 30 mL にアセトニトリル 70 mL を加え、十分に混合したものをオートサンブラ洗浄液とした。調製後は室温で保存し、13 日間以内に使用した(調製日を 0 日として起算)。

洗浄用注入液：テトラヒドロフランそのものを洗浄用注入液とした。

試料溶液の調製：被験物質調製液の採取点数は、濃度確認試験および安定性試験については被験物質調製液の中層付近から 3 点とし、均一性試験については被験物質調製液の上、中、下層付近から各 3 点の計 9 点とした。均一性試験の中層の濃度を安定性試験の調製時の分析結果とした。

各被験物質調製液を採取し、被験物質の最終濃度が 10~100 μ g/mL、対照溶媒の割合が 5% 以下となるようにテトラヒドロフランを加えたものを試料溶液とした。試料溶液の調製は 1 点につき 1 回、HPLC への注入は各 1 回とした。

HPLC システムおよび測定条件は以下の通りである。

高速液体クロマトグラフ (HPLC)

高速液体クロマトグラフ (HPLC)

UV-VIS Detector	L-4200	株式会社 日立製作所
Intelligent Pump	L-6200	株式会社 日立製作所
Column Oven	L-5025	株式会社 日立製作所
Autosampler	AS-2000	株式会社 日立製作所
Degasser	ERC-3315 α	株式会社 イーアールシー
データ処理装置	Empower 2	日本ウォーターズ 株式会社

測定条件

カラム	: TSK-GEL ODS-80TM、4.6 mm I.D. ×150 mm、東ソー株式会社
移動相	: 蒸留水 : アセトニトリル : テトラヒドロフラン : トリエチルアミン : 酢酸 = 400 : 450 : 150 : 1 : 1
オートサンブラ洗浄液	: 蒸留水/アセトニトリル (30 : 70)
洗浄用注入液	: テトラヒドロフラン
測定波長	: 294 nm
カラム温度	: 40℃
流量	: 1 mL/min
注入量	: 10 μL
オートサンブラ温度	: 7℃
分析時間	: 8 分

Empower 2 を用いて標準溶液のピーク面積と濃度[7. (1) 参照]から作成した検量線より、各試料溶液の測定濃度を求め、以下の式より調製液中の被験物質濃度、変動係数、含有率および残存率を算出した。

$$\text{被験物質濃度 (mg/mL)} = \frac{\text{測定濃度 (}\mu\text{g/mL)} \times \text{希釈係数}}{1000}$$

$$\text{変動係数 (\%)} = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均値}} \times 100$$

$$\text{含有率 (\%)} = \frac{\text{被験物質濃度平均値}}{\text{調製液の表示濃度}} \times 100$$

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{保存後の被験物質濃度平均値}}{\text{調製時の被験物質濃度平均値}} \times 100$$

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター生産の SPF Cr1:CD(SD) ラットを用いた。ラットは毒性試験等で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

雄雌各 42 匹(発注数 雄雌各 40 匹)を 2007 年 4 月 4 日に 4 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 82~95 g、雌で 61~76 g であった。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について雄は馴化 6 日(受入日を馴化 1 日として起算)まで、雌は馴化 7 日まで、一般状態観察を 1 日 1 回、さらに受入日と検疫および馴化期間終了日(群分け日)に体重測定を実施した。その結果、検疫および馴化期間中に異常は認められなかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間終了後、健康な動物を雄雌各 42 匹から 36 匹を選抜して、5 週齢で試験に供した。検疫および馴化期間終了日(投与開始前々日)の体重に基づいて、層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行った。群分け時の動物の体重範囲は、雄で 135~150 g、雌で 107~120 g であり、平均体重(雄 143.8 g、雌 113.3 g)の±20%以内であった。選抜から外れた動物雄雌各 6 例は試験から除外して安楽死とした。なお、選抜された動物について投与開始前日に一般状態に異常がないことを確認した。

(4) 動物およびケージの識別

動物は、群分け前は受入時に油性フェルトペンで尾部に印を付け、群分け後は耳介に動物番号を入墨し、個体識別を行った。

飼育ケージは、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに試験番号および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。群分け後はさらに試験群を明記した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物は温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測範囲 $21 \sim 24^{\circ}\text{C}$)、湿度 $50 \pm 20\%$ (実測範囲 $41 \sim 52\%$)、換気回数 $10 \sim 15$ 回/時間、照明時間 12 時間 (8:00~20:00、人工照明) の動物飼育室 (302 号室) で飼育した。

2) 飼育器材および飼育方法

ブラケット式金属製金網床ケージ (260W×380D×180H, mm) に、検疫および馴化期間中は雄雌別に 3 匹ずつ、群分け後は 1 匹ずつ収容した。ケージおよび給餌器は群分け時に 1 回、その後は 2 週に 1 回交換した。受皿は週 2 回洗浄滅菌済みのものと交換した。自動給水装置の水抜きは週 1 回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、1 日 1 回実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を 1 週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製、 γ 線照射固型飼料 CRF-1 を、金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロット (070117) の飼料について分析した。汚染物質の分析は財団法人 日本食品分析センターにおいて、微生物検査は飼料製造業者がそれぞれ行った。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった (Appendix 3-1~3-2)。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。ただし、尿検査時には給水瓶を使用した。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2007 年 4 月 2 日および 2007 年 7 月 2 日に当該飼育室と同系統配管の最末端 (301 号室) から試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社が行った。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった (Appendix 4-1 および 4-2)。

(6) 試験群の構成

試験群の構成と各群の動物番号を以下に示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数(動物番号)	
			雄	雌
＜毒性試験群＞				
対照群	0	0	6 (101～106)	6 (151～156)
低用量群	40	4	6 (201～206)	6 (251～256)
中用量群	200	20	6 (301～306)	6 (351～356)
高用量群	1000	100	6 (401～406)	6 (451～456)
＜回復性試験群＞				
対照群	0	0	6 (107～112)	6 (157～162)
高用量群	1000	100	6 (407～412)	6 (457～462)

対照群には、他の群と同様の方法で媒体のみを投与した。

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

1 群につき雄雌各 3 匹の SD 系ラット[CrI:CD(SD)]に、トウモロコシ油に溶解させた被験物質の 0(対照)、100、300 および 1000 mg/kg を 14 日間反復経口投与した予備試験(S R 0 6 1 1 2 P)³⁾の結果、300 mg/kg の雄雌ともに肝臓の絶対あるいは相対重量の有意な高値や高値傾向、雄に ALT の有意な高値がみられ、1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに摂餌量の過性の減少、総蛋白、ALT および総コレステロールの有意な高値や高値傾向、肝臓の暗褐色化および肝臓の絶対あるいは相対重量の有意な高値や高値傾向が認められた。これらのことから、28 日間反復経口投与毒性試験では、投与期間が倍になることを考慮し、1000 mg/kg/day を最高用量に設定し、以下公比 5 で除し、200 および 40 mg/kg/day を中用量および低用量に設定した。なお、対照群および 1000 mg/kg/day の 2 用量については 28 日間投与後 14 日間休薬による回復性を検討する回復性試験群を設定した。

2) 投与

被験物質がヒトに経口的に暴露される可能性を考慮し、OECD 試験法ガイドライン(407)に従って、1 日 1 回 28 日間、9:00～12:00、尿検査時は 11:30～12:00 の間にディスポーザブル胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて強制的に胃内に経口投与した。

投与容量は 10 mL/kg とし、各個体の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出した。

(8) 観察、測定および検査項目

1) 一般状態観察

全例について個々の動物の生死、外観、行動等について、投与開始日を投与 1 日、投与 28 日の翌日を回復 1 日として起算し、投与 1 日から剖検日(投与 28 日あるいは回復 14 日の翌日)まで午前(投与前)および午後の 1 日 2 回、剖検日は午前中に 1 回観察した。

2) 詳細な一般状態観察

全例について、投与開始前ならびに投与 7、14、21 および 28 日、回復 7 および 14 日に、詳細な一般状態観察を行った。観察項目は、ケージ外から姿勢、眼瞼閉鎖、呼吸、振戦・痙攣、常同行動/回転・旋回、異常行動/自傷について、ケージから取り出す時に取り出し易さ、扱い易さ、筋緊張、立毛、被毛の状態、皮膚、眼球突出、瞳孔径、可視粘膜、流涙、流涎、体温について、オープンフィールド内で痙攣、歩行、覚醒状態、排尿、排糞、常同行動/毛繕い・匂嗅ぎ、異常行動/後方突進・発声、呼吸について、それぞれあらかじめ定めたスコアリング法を用いてスコアを記録した。

3) 機能検査

全例について、投与 4 週および回復 2 週に、機能検査および以下の測定を行った。検査台上で視覚(接近反応)、触覚(接触反応)、聴覚(音に対する反応)、痛覚(尾根部を挟む)、固有受容反応(強制姿勢からの復帰)、空中正向反射についてあらかじめ定めたスコアリング法を用いて観察し、そのスコアを記録した。また、握力および自発運動量を測定した。握力は CPU ゲージ(アイコーエンジニアリング株式会社)を用いて前肢および後肢の握力を各 3 回測定し、1 g 単位で記録した。自発運動量は自発運動量測定装置(スーパーメックスおよび CompACT AMS、室町機械株式会社)を用いて測定し、データの収集間隔を 10 分として 1 時間測定した。

4) 体重測定

全例について、投与 1、7、14、21 および 28 日の投与前、回復 7 および 14 日ならびに剖検日に電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定し、1 g 単位で記録した。

以下の式により体重増加量および体重増加率を算出した。

投与期間

$$\text{体重増加量(g)} = \text{投与 28 日体重(g)} - \text{投与 1 日体重(g)}$$

$$\text{体重増加率(\%)} = \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{投与 1 日体重(g)}} \times 100$$

回復期間

$$\text{体重増加量(g)} = \text{回復 14 日体重(g)} - \text{投与 28 日体重(g)}$$

$$\text{体重増加率(\%)} = \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{投与 28 日体重(g)}} \times 100$$

5) 摂餌量測定

全例について、投与 1、7、14、21 および 28 日の投与前、回復 7 および 14 日に、電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて各ケージの給与量と残量を測定し、1 g 単位で記録した。以下の式により摂餌量(g/rat/day)を算出した。

$$\text{摂餌量(g/rat/day)} = \frac{\text{給与量(g/rat)} - \text{残量(g/rat)}}{\text{測定日間の日数(day)}}$$

6) 尿検査

全例について投与 4 週および回復 2 週に、非絶食下でラット用代謝ケージ(KN-646、B-1 型、夏目製作所)を用いて採尿し、投与直後から約 3 時間の蓄尿で①～⑧を、また約 21 時間の蓄尿で⑨および⑩を実施した。採取した尿は検査終了後廃棄した。

検査項目および検査方法：

①pH	試験紙法(マルティステックス、バ イエル メディカル)
②蛋白(Protein)	試験紙法(マルティステックス、バ イエル メディカル)
③糖 (Glucose)	試験紙法(マルティステックス、バ イエル メディカル)
④ケトン体(Ketone body)	試験紙法(マルティステックス、バ イエル メディカル)
⑤ウロビリノーゲン(Urobilinogen)	試験紙法(マルティステックス、バ イエル メディカル)
⑥ビリルビン(Bilirubin)	試験紙法(マルティステックス、バ イエル メディカル)
⑦潜血反応(Occult blood)	試験紙法(マルティステックス、バ イエル メディカル)
⑧色調(Color)	肉眼観察
⑨尿量(Urine Volume)	容量測定
⑩比重(Specific gravity)	屈折計法(尿比重屈折計コリコン-S、アタゴ)

7) 血液学的検査

全例について剖検時に 16～19 時間の絶食下でラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈より採血した。①～⑩については EDTA・2K (ベノジェクト II 真空採血管、テルモ株式会社) で処理した血液約 1 mL を用い、⑪、⑫については 3.8% クエン酸ナトリウムで処理した血液約 1～2 mL を 3500 回転/分で 10 分間遠心分離して得られた血漿を用いた。得られた血液および血漿は検査終了後廃棄した。

検査項目および検査方法：

①赤血球数(RBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
②ヘマトクリット値(Ht)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
③ヘモグロビン量(Hb)	シアンメトヘモグロビン法 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
④平均赤血球容積(MCV)	RBC, Ht 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑤平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	RBC, Hb 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑥平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	Ht, Hb 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑦網赤血球数(Reticulocyte)	Brocher 法(鏡検)
⑧血小板数(Platelet)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑨白血球数(WBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、シスメックス)
⑩白血球百分比 (Differential count of WBC)	May-Grünwald-Giemsa 染色(鏡検)
⑪プロトロンビン時間(PT)	トロンボプラスチン法 (血液凝固自動測定装置 KC4デルタ、トリニティ・バイオテック)
⑫活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	エラジン酸法 (血液凝固自動測定装置 KC4デルタ、トリニティ・バイオテック)

8) 血液化学的検査

全例について剖検時に 16～19 時間絶食させたラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈より採血した。検査項目のうち①および⑤については血液 1 mL あたりへパリンナトリウム(ヘパリンナトリウム注 N「味の素」、1000 単位/mL、味の素株式会社)約 20 単位で処理後、3500 回転/分で 10 分間の遠心分離で得られた血漿を用いて検査した。他の項目については分離剤入り試験管(セパクリーン、栄研器材株式会社)に血液を採取し、3500 回転/分で 10 分間の遠心分離で得られた血清を用いて検査した。得られた血漿および血清は検査終了後、-20℃以下で凍結保存し、最終報告書提出後、廃棄する。

検査項目および検査方法：

①AST	JSCC 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
②ALT	JSCC 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
③アルカリホスファターゼ (ALP)	JSCC 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
④γ-GTP	L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑤グルコース (Glucose)	ヘキソキナーゼ法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑥総コレステロール (T-Cho)	酵素法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑦トリグリセリド (TG)	遊離グリセロール消去法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑧総ビリルビン (T-Bil)	アゾビリルビン法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑨尿素窒素 (UN)	ウレアーゼ・GLDH 法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑩クレアチニン (Crea)	Jaffé 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑪ナトリウム (Na)	イオン選択電極 (ISE) 法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑫カリウム (K)	イオン選択電極 (ISE) 法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑬クロール (Cl)	イオン選択電極 (ISE) 法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑭カルシウム (Ca)	OCPC 法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑮無機リン (IP)	Fiske-Subba Row 法 (自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑯総蛋白 (TP)	ビウレット法(自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ)
⑰蛋白分画 (Protein fraction)	セルロースアセテート膜電気泳動法 (自動電気泳動装置 AES320、三島オリンパス)
⑱A/G 比 (A/G ratio)	蛋白分画より算出
⑲アルブミン (Albumin)	総蛋白と蛋白分画より算出

9) 剖検

全例について、投与 28 日の翌日および回復 14 日の翌日に剖検した。体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後、放血により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、以下の器官・組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定・保存した。なお、眼球およびハーダー腺はデビッドソン液で固定・保存し、精巣および精巣上体はブアン液で固定、70% エタノールに保存した。肺については固定液を注入後浸漬固定とした。左右のある器官については、原則として左右とも固定・保存した。

器官・組織名：脳(大脳、小脳および延髄)、下垂体、脊髄、胸腺、甲状腺、上皮小体、副腎、脾臓、心臓、舌、食道、胃、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節、気管、肺、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊(凝固腺含む)、卵巣、子宮、膺、眼球、ハーダー腺、大腿骨(骨髓含む、右)、坐骨神経および肉眼的異常部位として、1 例(No. 456)の癒着の認められた正常組織との境界部を含む胸腔内諸器官(肺・気管・食道・心臓・胸腺・横隔膜・壁側胸膜)。

10) 器官重量測定

全例について、剖検時に電子式上皿天秤(ER-180A、株式会社 エー・アンド・デイ)を用いて以下の器官について重量を測定した。なお、左右のある器官については、左右合わせて測定した。

器官名：脳、下垂体、甲状腺、副腎、脾臓、心臓、肝臓、腎臓、胸腺、精巣、精巣上体、前立腺、精囊(凝固腺含む)、卵巣、子宮

以下の式により相対重量を算出した。

$$\text{相対重量(\%)} = \frac{\text{絶対重量(g)}}{\text{剖検日体重(g)}} \times 100$$

11) 病理組織学的検査

剖検時に固定・保存した全例の全器官・組織についてパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、対照群および高用量群の全例について鏡検した。

鏡検の結果、被験物質投与の影響と考えられる変化の認められた肝臓および腎臓については、その他の投与群の動物についても全例鏡検した。また、対照群および高用量群の代表例について、免疫染色による α_{2u} -グロブリン(R&D Systems, Inc.; 抗体、ダコ・ジャパン株式会社; LSAB2 キット/HRP) の確認を行った。

なお、雄 1 例(No. 106)および雌 7 例(No. 151~154、156、254、255)の肝臓について Oil red O 染色標本も作製し、中性脂肪の有無を確認した。

5. 統計学的方法

投与期間中は回復群の動物を合わせて集計した。

握力、自発運動量、体重、体重増加量および増加率、摂餌量、尿量、血液学的検査、血液化学的検査、器官の絶対重量および相対重量の成績について平均値および標準偏差を算出し、Bartlett の検定法により等分散性を解析した。等分散 ($p > 0.05$) の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散 ($p \leq 0.05$) の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差が認められた場合 ($p \leq 0.10$) は Dunnett の検定法を用いて対照群との比較を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差が認められた場合 ($p \leq 0.10$) は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照群との比較を行った。

詳細な一般状態観察および機能検査の観察項目、尿検査の定性的項目および尿比重の成績について Kruskal-Wallis の検定法で解析し、有意差が認められた場合 ($p \leq 0.10$) は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照群との比較を行った。

対照群との比較検定については、有意水準を 5% とした。なお、統計学的方法に関する表示方法を INDIVIDUAL DATA の冒頭に示す。

成 績

1. 一般状態

一般状態の成績を Table 1 および 2、INDIVIDUAL DATA 1-1-1～1-2-4 に示す。

[投与期間]

対照群ならびに 40 mg/kg 投与群では、雄雌ともに異常は認められなかった。

200 mg/kg 投与群では、雌 1 例 (No. 356) で投与 12 日に外尿道口周囲の被毛汚れが認められた。雄には投与期間中に異常は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群では、雄 2 例 (No. 403、411) で投与 3 日によるめき歩行が認められた。雌では 1 例 (No. 456) で投与 3 日によるめき歩行が認められ、他に 2 例 (No. 456、461) で外尿道口周囲の被毛汚れが散見された。

[回復期間]

対照群および 1000 mg/kg の雄雌ともに異常は認められなかった。

2. 詳細な一般状態観察

詳細な一般状態観察の成績を Table 3～8、INDIVIDUAL DATA 2-1-1～4-14-2 に示す。

[投与期間]

各投与群の雄雌ともに、いずれの検査時にも各観察項目に対照群と比較して有意な差は認められず、また、鎮静、興奮あるいは行動異常等の神経行動学的な異常も認められなかった。

[回復期間]

1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに、いずれの検査時にも各観察項目に対照群と比較して有意な差は認められず、鎮静、興奮あるいは行動異常等の神経行動学的な異常も認められなかった。

3. 機能検査

機能検査の成績を Table 9～12、INDIVIDUAL DATA 5-1-1～6-4-2 に示す。

[投与 4 週]

40 mg/kg 投与群では、雄の自発運動量で測定開始後 0-10 分に対照群と比較して有意な高値が認められた。雌には有意な変化は認められなかった。

200 mg/kg 投与群では、雄の自発運動量で測定開始後 20-30 分に有意な低値が認められた。雌には有意な変化は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群では、雄雌の自発運動量で、雄は測定開始後 40-50 分に、雌は 0-10 および 10-20 分に有意な低値が認められた。

[回復 2 週]

1000 mg/kg 投与群の雄で後肢の握力に対照群と比較して有意な低値が認められた。雌では自発運動量で測定開始後 40-50 分に有意な高値が認められた。

4. 体重推移

体重推移を Figure 1 および 2、Table 13 および 14、INDIVIDUAL DATA 7-1-1～7-2-4 に示す。

[投与期間]

40 および 200 mg/kg 投与群では、雄雌ともに平均体重、投与期間の体重増加量および増加率に対照群と比較して有意な差は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群では、雄で投与 7 日以降投与終了まで有意な低値が継続して認められ、投与期間中の体重増加量および増加率にも有意な低値が認められた。雌には有意な差は認められなかった。

[回復期間]

1000 mg/kg 投与群の雄で、投与期間中に引き続き回復期間中も対照群と比較して有意な低値が認められたが、回復期間中の体重増加量および増加率には有意な高値が認められた。雌には平均体重、回復期間中の体重増加量および増加率に有意な差は認められなかった。

5. 摂餌量

摂餌量を Figure 3 および 4、Table 15 および 16、INDIVIDUAL DATA 8-1-1～8-2-4 に示す。

[投与期間]

40 mg/kg 投与群では、雄雌ともに対照群と比較して有意な差は認められなかった。

200 mg/kg 投与群では、雄で投与 7 日に有意な低値が認められた。雌には有意な差は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群では、雄雌ともに投与 7 日に有意な低値が認められた。

[回復期間]

1000 mg/kg 投与群の雌で回復 7 日に対照群と比較して有意な高値が認められた。雄には有意な差は認められなかった。

6. 尿検査

尿検査の成績を Table 17～20、INDIVIDUAL DATA 9-1-1～9-4-2 に示す。

[投与 4 週]

40 および 200 mg/kg 投与群では、雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群では、雄雌ともに有意差を伴う尿 pH および尿蛋白の低下ならびに尿量の増加が認められた。また、雌には有意差を伴う尿比重の低下も認められた。

[回復 2 週]

1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

7. 血液学的検査

血液学的検査の成績を Table 21～24、INDIVIDUAL DATA 10-1-1～10-4-4 に示す。

[投与期間終了時]

40 および 200 mg/kg 投与群では、雄雌ともに有意な変化は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群では、雌に網赤血球数の有意な高値および活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。雄には有意な変化は認められなかった。

[回復期間終了時]

1000 mg/kg 投与群の雄に白血球百分比の分葉核好中球比率に対照群と比較して有意な高値およびリンパ球比率に有意な低値が認められた。雌では、網赤血球数の有意な高値、プロトロンビン時間の有意な短縮および活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。

以下に、有意な変化の認められた項目について背景データを示す。

ラット、9 週齢：投与期間終了時 項目	雄		雌	
	平均値	範囲	平均値	範囲
網赤血球数(%)	27	12～43	23	10～36
活性化部分トロンボプラスチン時間 (sec)	26.9	20.9～34.5	19.8	16.4～23.3

ラット、11 週齢：回復期間終了時 項目	雄		雌	
	平均値	範囲	平均値	範囲
網赤血球数(%)	23	13～33	22	10～34
プロトロンビン時間(sec)	16.6	12.3～22.5	14.9	11.3～18.5
活性化部分トロンボプラスチン時間 (sec)	26.3	21.0～32.9	19.5	13.6～25.4
分葉核好中球比率(%)	5.2	1.3～20.4	5.5	1.9～15.9
リンパ球比率(%)	89.9	81.7～98.1	90.3	82.5～98.1

8. 血液化学的検査

血液化学的検査の成績を Table 25～28、INDIVIDUAL DATA 11-1-1～11-4-4 に示す。

[投与期間終了時]

40 mg/kg 投与群では、雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

200 mg/kg 投与群では、雄の蛋白分画で α_2 グロブリン分画比およびALTの有意な高値が認められた。雌ではアルブミンおよび総コレステロールの有意な高値が認められた。

1000 mg/kg 投与群では、雄雌ともに総蛋白、ALT、 γ -GTP、総コレステロールおよびカルシウム、蛋白分画で α_2 グロブリン分画比の有意な高値ならびにASTの有意な低値が認められた。さらに、雄ではクレアチニン、無機リンおよび蛋白分画の β グロブリン分画比の有意な高値ならびにアルブミン分画比およびA/G比の有意な低値、雌ではアルブミンの有意な高値が認められた。

[回復期間終了時]

1000 mg/kg 投与群の雄で、グルコースに対照群と比較して有意な低値、無機リンに有意な高値が認められた。雌ではグルコースおよび総コレステロールに有意な高値ならびにアルカリホスファターゼの有意な低値が認められた。

以下に、有意な変化の認められた項目について背景データを示す。

ラット、9 週齢：投与期間終了時 項目	雄		雌	
	平均値	範囲	平均値	範囲
総蛋白(g/dL)	5.5	5.0～5.9	5.7	5.0～6.3
アルブミン(g/dL)	2.3	1.8～2.8	2.5	1.9～3.2
A/G 比(ratio)	1.19	1.01～1.37	1.39	1.17～1.61
アルブミン分画比(%)	54.3	50.7～57.9	58.2	54.3～62.1
α_2 グロブリン分画比(%)	7.5	4.3～10.7	6.0	3.5～10.3
β グロブリン分画比(%)	14.4	10.3～18.4	14.0	9.9～18.1
AST (IU/L)	68	52～85	64	45～92
ALT (IU/L)	27	18～36	22	14～34
γ -GTP (IU/L)	0.5	0.1～1.7	0.8	0.4～1.8
総コレステロール(mg/dL)	60	36～85	63	35～92
クレアチニン(mg/dL)	0.42	0.33～0.51	0.46	0.36～0.56
カルシウム(mg/dL)	9.5	8.9～10.1	9.4	8.7～10.1
無機リン(mg/dL)	8.6	7.2～9.9	7.3	5.5～9.1

ラット、11 週齢：回復期間終了時 項目	雄		雌	
	平均値	範囲	平均値	範囲
ALP (IU/L)	357	223～571	185	99～271
グルコース(mg/dL)	163	127～199	137	102～172
総コレステロール(mg/dL)	61	35～87	67	45～100
無機リン(mg/dL)	7.5	6.2～8.8	6.0	4.6～7.9

9. 剖検

剖検所見を Table 29 および 30、INDIVIDUAL DATA 12-1-1～12-4-2 に示す。

[投与期間終了時]

対照群ならびに 40 および 200 mg/kg 投与群では、雄雌ともに異常所見は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群では、雄雌全例(雌雄各 6 例)の肝臓に暗褐色化が認められ、雄 3 例(No. 403、405、406)および雌 2 例(No. 452、453)で肥大が認められた。他に、雄 1 例(No. 404)の左精巣の肥大、雌 1 例(No. 456)に胸腔内諸器官(肺・気管・食道・心臓・胸腺・横隔膜・壁側胸膜)の癒着が認められた。

[回復期間終了時]

対照群では、雄雌ともに異常所見は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群では、雌 1 例(No. 462)に肝臓の暗褐色化が認められた。雄には異常所見は認められなかった。

10. 器官重量

器官重量の成績を Table 31～34、INDIVIDUAL DATA 13-1-1～13-4-4 に示す。

[投与期間終了時]

40 mg/kg 投与群では、雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

200 mg/kg 投与群では、雄雌の肝臓の相対重量に有意な高値が認められた。

1000 mg/kg 投与群では、雄雌の肝臓の絶対および相対重量に有意な高値が認められ、雄では腎臓、副腎および精巣の相対重量に有意な高値、前立腺の絶対重量に有意な低値が認められ、雌では副腎の絶対重量に有意な低値が認められた。

[回復期間終了時]

1000 mg/kg 投与群の雄に対照群と比較して心臓の絶対および相対重量の有意な低値が認められ、他に腎臓、脳、精巣および精囊の相対重量に有意な高値が認められた。雌では、肝臓および心臓の絶対および相対重量に有意な高値が認められ、他に、脾臓および胸腺の絶対重量に有意な高値が認められた。なお、雄には剖検時の体重に有意な低値が認められた。

以下に、有意な変化の認められた項目について背景データを示す。

ラット、9 週齢：投与期間終了時		雄		雌	
項目		平均値	範囲	平均値	範囲
肝臓	絶対重量(g)	10.710	7.331～14.088	6.412	4.953～7.872
	相対重量(%)	3.111	2.591～3.630	3.059	2.612～3.505
腎臓	絶対重量(g)	2.688	2.064～3.312	1.706	1.390～2.023
	相対重量(%)	0.785	0.657～0.914	0.817	0.669～0.964
副腎	絶対重量(mg)	55.4	39.2～71.6	65.6	50.0～81.3
	相対重量(10 ⁻³ %)	16.279	11.022～21.536	31.508	22.914～40.101
精巣	絶対重量(g)	3.094	2.585～3.604	※	※
	相対重量(%)	0.910	0.686～1.134	※	※
前立腺	絶対重量(mg)	456.9	224.0～689.7	※	※
	相対重量(10 ⁻³ %)	129.926	80.356～179.496	※	※

ラット、11 週齢：回復期間終了時		雄		雌	
項目		平均値	範囲	平均値	範囲
肝臓	絶対重量(g)	13.110	9.420～16.800	6.760	5.239～8.282
	相対重量(%)	3.071	2.595～3.546	2.858	2.536～3.180
腎臓	絶対重量(g)	3.108	2.417～3.800	1.771	1.437～2.105
	相対重量(%)	0.731	0.625～0.836	0.750	0.662～0.838
脾臓	絶対重量(g)	0.716	0.489～0.943	0.466	0.304～0.629
	相対重量(%)	0.168	0.124～0.212	0.198	0.128～0.268
心臓	絶対重量(g)	1.411	1.142～1.679	0.843	0.667～1.018
	相対重量(%)	0.332	0.281～0.383	0.357	0.306～0.407
脳	絶対重量(g)	2.138	1.981～2.295	1.955	1.809～2.100
	相対重量(%)	0.505	0.426～0.585	0.832	0.694～0.970
胸腺	絶対重量(mg)	557.8	320.2～795.4	437.4	258.3～616.4
	相対重量(10 ⁻³ %)	131.878	83.774～179.981	184.796	123.048～246.543
精巣	絶対重量(g)	3.224	2.607～3.841	※	※
	相対重量(%)	0.762	0.591～0.932	※	※
精囊	絶対重量(g)	1.491	1.053～1.930	※	※
	相対重量(%)	0.351	0.240～0.462	※	※

※該当なし

11. 病理組織学的検査

病理組織学的所見を Table 35 および 36、INDIVIDUAL DATA 14-1-1～14-4-2 に示す。

[投与期間終了時]

肝臓：1000 mg/kg 投与群の雄雌全例(各 6 例)に軽度な小葉中心性肝細胞肥大が認められた。

他には各投与群の雄雌ともに対照群と比較して例数増加やグレードの増強を示す変化は認められなかった。

腎臓：1000 mg/kg 投与群では、雄全例(6 例)に軽度な近位尿細管上皮の硝子滴および好酸性小体が認められた。この硝子滴および好酸性小体には α_{2u} -グロブリンの陽性反応が認められた。

他には各投与群の雄雌ともに対照群と比較して例数増加やグレードの増強を示す変化は認められなかった。

その他の器官・組織：各投与群の雄雌ともに対照群と比較して例数増加やグレードの増強を示す変化は認められなかった。

[回復期間終了時]

肝臓：1000 mg/kg 投与群の雌 1 例(No. 462)に軽度な小葉中心性肝細胞肥大が認められた。

他には各投与群の雄雌ともに対照群と比較して例数増加やグレードの増強を示す変化は認められなかった。

腎臓：1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに対照群と比較して例数増加やグレードの増強を示す変化は認められなかった。

その他の器官・組織：1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに対照群と比較して例数増加やグレードの増強を示す変化は認められなかった。

以下に、対照群を含めた各群に認められた所見を示す。

		所見の認められた動物数						
		2-クロロハイドロキノンジメチルエーテル (mg/kg)						
器官・ 組織名	所見名	グ レ ー ド	毒性試験群				回復性試験群	
			0*	40	200	1000	0*	1000
<雄>								
肺	限局性線維化	+	-	※	※	1/6	-	-
	動脈の鉍質沈着	+	-	※	※	-	1/6	2/6
肝臓	小葉中心性肝細胞肥大	+	-	-	-	6/6	-	-
	小葉周辺性脂肪化	+	1/6	-	-	-	-	-
心臓	小肉芽腫	+	3/6	-	3/6	3/6	2/6	6/6
	限局性心筋変性	+	-	※	※	-	1/6	1/6
腎臓	近位尿細管上皮の硝子滴	+	-	-	-	6/6	3/6	2/6
	近位尿細管上皮の好酸性小体	+	-	-	-	6/6	3/6	5/6
	尿細管上皮の再生	+	4/6	-	-	2/6	1/6	4/6
	硝子円柱	+	-	1/6	-	-	-	-
	嚢胞	+	2/6	-	-	-	-	-
	限局性線維化	+	-	-	-	-	1/6	-
精巣	精細管の拡張	+	-	※	※	1/6	-	-
前立腺	炎症性細胞浸潤	+	-	※	※	-	1/6	3/6
下垂体	前葉の嚢胞	+	-	※	※	-	1/6	-
<雌>								
肺	泡沫細胞の集簇	+	1/6	※	※	-	1/6	-
	動脈の鉍質沈着	+	1/6	※	※	-	2/6	-
	骨化生	+	1/6	※	※	-	-	-
	胸膜の異物を伴う肉芽腫性炎	+++	-	※	※	1/6	-	-
食道	外膜の異物性肉芽腫	+	-	※	※	1/6	-	-
肝臓	小葉中心性肝細胞肥大	+	-	-	-	6/6	-	1/6
	小葉周辺性脂肪化	+	5/6	2/6	-	-	-	-
心臓	小肉芽腫	+	4/6	3/6	3/6	2/6	4/6	4/6
	心外膜の炎症	+	-	※	※	1/6	-	-
腎臓	尿細管上皮の再生	+	1/6	-	-	2/6	1/6	-
	限局性線維化	+	-	1/6	-	1/6	-	-
胸腺	被膜の異物性肉芽腫	+	-	※	※	1/6	-	-
壁側胸膜	異物を伴う肉芽腫性炎	+++	※	※	※	1/1	※	※

0*：対照群。 ※：実施せず。 -：該当なし。 +：軽度。 +++：重度。
肝臓の小葉周辺性脂肪化については、中性脂肪が確認されている。

考 察

2-クロロハイドロキノンジメチルエーテルの0(対照、トウモロコシ油)、40、200および1000 mg/kgを1群雄雌各6匹のCr1:CD(SD)ラットに、28日間反復経口投与して毒性発現の有無およびその概要を検討した。さらに、0および1000 mg/kgについて1群雄雌各6匹の回復群を設け、投与終了の翌日から14日間観察を継続し休薬による毒性の回復性を併せて検討した。

一般状態では、1000 mg/kg投与群の雄2例および雌1例に投与3日によるめき歩行が認められた。用量設定根拠として予備試験³⁾では、同様の变化は認められなかったが、通常の飼育管理で認められる変化ではないことから、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

一方、1000 mg/kg投与群の雌2例、200 mg/kg投与群の雌1例に外尿道口周囲の被毛汚れが認められたが、発現頻度が低く、媒体にトウモロコシ油を用いていることから、媒体による偶発的な変化と考えられ、被験物質投与との関連性はないと判断した。

回復期間期間中には対照群および1000 mg/kg投与群の雄雌ともに異常は認められなかった。

詳細な一般状態観察では、各投与群の雄雌ともに投与期間および回復期間のいずれにも被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

機能検査では、投与4週に40 mg/kg投与群の雄に自発運動量の測定開始後0-10分に有意な高値、200 mg/kg投与群の雄に自発運動量の測定開始後20-30分および1000 mg/kg投与群の雄に自発運動量の測定開始後40-50分、雌の0-10および10-20分に有意な低値が認められたが、いずれも一過性かつ総運動量に有意差のみられない変化であり、被験物質投与との関連性はないと考えられた。

回復2週には、1000 mg/kg投与群の雌で自発運動量の測定開始後40-50分に有意な高値および雄に後肢の握力の有意な低値が認められたが、この変化は投与4週には認められていないこと、末梢神経に病理組織学的な変化が認められていないことから、被験物質投与との関連性はないと考えられた。

体重推移では、1000 mg/kg投与群の雄に投与7日以降投与終了まで有意な低値が継続して認められ、また、投与期間中の体重増加量および増加率にも有意な低値が認められたことから、この変化は被験物質投与に関連した体重増加抑制と考えられた。平均体重の有意な低値は、回復期間中にも継続して認められたが、回復期間中の体重増加量および増加率は有意な高値を示し、回復性を示すものと考えられた。

一方、雌では各投与群ともに投与期間および回復期間のいずれにも被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

摂餌量では、200および1000 mg/kg投与群の雄ならびに1000 mg/kg投与群の雌に投与7日に有意な低値が認められたが、一過性の低値であり毒性学的な意義はないと考えられた。また、回

復期間中に雌で認められた一過性の高値についても、投与期間終了時には有意な差が認められていないことから、偶発的な有意差と考えられた。

尿検査では、投与 4 週に 1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに有意差を伴う尿 pH および尿蛋白の低下ならびに尿量の増加が認められ、雌には尿比重の有意な低下も認められた。これらの変化から、被験物質投与による腎機能への影響が示唆された。

しかし、回復 2 週には 1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに有意な変化は認められず、投与終了により速やかな回復性を示すものと考えられた。

血液学的検査では、投与期間終了時に 1000 mg/kg 投与群の雌に網赤血球数の有意な高値および活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められ、また、回復期間終了時には 1000 mg/kg 投与群の雄に白血球百分比の分葉核好中球比率に有意な高値およびリンパ球比率に有意な低値、雌に網赤血球数の有意な高値、プロトロンビン時間の有意な短縮および活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められ、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

雌の網赤血球数および凝固系の変化については、投与および回復のいずれの期間終了時にも認められているが、赤血球系のパラメーターに変化がないことから軽微な変化と考えられた。

一方、雄の白血球百分比の変化については、白血球数に有意な変化が認められないことから、毒性学的な意義はないと考えられた。

血液化学的検査では、投与期間終了時に 1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに総蛋白、ALT、 γ -GTP、総コレステロールおよびカルシウムの有意な高値、蛋白分画における α_2 グロブリンの有意な高値が認められた。これらの変化は雄雌ともに認められていること、あるいは、背景データの範囲を逸脱する項目があることから、被験物質投与に関連した変化と考えられた。総蛋白および ALT の高値や総コレステロール、蛋白分画の変化ならびに γ -GTP の高値については肝臓重量の高値および小葉中心性肝細胞肥大が認められていることから肝機能の亢進に関連した変化と考えられた。また、 γ -GTP の高値については、肝・胆道系への影響も示唆された。カルシウムの高値については、甲状腺重量や雄のアルブミン濃度には変化が認められないが、雌のアルブミン濃度や雄雌の血清蛋白に有意な高値が認められていることから、この血清蛋白の高値に関連した変化と推察された。200 mg/kg 投与群でも雄に α_2 グロブリン分画比および ALT の有意な高値、雌にアルブミンおよび総コレステロールの有意な高値が認められ、1000 mg/kg 投与群と同様の変化であることから被験物質投与に関連した変化と考えられた。

一方、1000 mg/kg 投与群の雄に A/G 比および蛋白分画におけるアルブミンやグロブリンの分画比の有意な低値あるいは高値、雌に蛋白分画における α_2 グロブリンの有意な高値が認められたが、この変化は、アルブミン濃度が有意な高値であるのに対しアルブミン分画比は正常である等による見かけ上の有意差と考えられた。なお、投与期間終了時に AST の低値が認められたが、臨床的・毒性学的意義はないと判断した。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群の雌に総コレステロールの有意な高値が認められたが、背景データの範囲内の数値であり、回復性を示すものと考えられた。

一方、雄にグルコースの有意な低値および無機リンの有意な高値、雌にアルカリホスファターゼの有意な低値およびグルコースの有意な高値が認められたが、これらはいずれも背景データの範囲内の数値であること、投与終了時には認められていない変化であることから、毒性学的な意義のない、偶発的な変化と考えられた。

剖検所見では、投与期間終了時に 1000 mg/kg 投与群の雄雌全例に肝臓の暗褐色化、雄 3 例および雌 2 例に肝臓の肥大が認められ、いずれも器官重量や血液化学的検査の変化を伴うことから、被験物質投与に関連した変化と考えられた。しかし、この変化は、回復期間終了時では雌 1 例に肝臓の暗褐色化が認められたのみであり、消失あるいは軽減していることから、可逆性の変化と考えられた。

なお、投与期間終了時に 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた精巣の肥大(片側性)および回復期間終了時に 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた胸腔内器官の相互癒着については、いずれも 1 例のみの発現であることから、精巣の肥大は先天性あるいは自然発生による変化、また、胸腔内器官の相互癒着は投与の過誤等に起因する可能性が考えられた。

器官重量では、投与期間終了時に 200 mg/kg 投与群の雄雌ともに肝臓の相対重量の有意な高値、1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに肝臓の絶対および相対重量の有意な高値が認められ、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

また、1000 mg/kg の雄の腎臓の相対重量に有意な高値が認められ、雄全例の腎臓に病理組織学的検査における軽度な近位尿細管上皮の硝子滴および好酸性小体が認められたことから、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

1000 mg/kg の雌で副腎の絶対重量に有意な低値が認められ、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

一方、1000 mg/kg 投与群の雄の前立腺にみられた絶対重量の有意な低値や雄の精巣にみられた相対重量の有意な高値については、この用量群では雄の体重が低値であること、雄 1 例で左精巣の肥大が認められていること、いずれも病理組織学的な変化を伴っていないことから、見かけ上の有意差と判断され、毒性学的な意義はないと考えられた。

回復期間終了時にも、1000 mg/kg 投与群の雌に肝臓の絶対および相対重量の有意な高値が認められたが、これらの平均値は投与終了時よりも低値であること、また、相対重量についてのみ背景データを逸脱する高値であることから、回復性が認められると判断した。

なお、肝臓以外の器官に認められている統計学的な有意差については、雄では投与期間終了時から体重の低値が継続して認められ、一方、雌では休薬後に対照群を上回る体重となっていること、いずれも背景データの範囲内であることから、毒性学的意義はないと考えられた。

病理組織学的検査では、重量増加の認められた肝臓で 1000 mg/kg 投与群の雄雌ともに肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が、また、1000 mg/kg 投与群の雄に腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴および好酸性小体(α_{2u} -グロブリン染色陽性)が認められ、いずれも被験物質投与に関連した変化と考えられた。

これらの変化は、回復期間終了時には消失あるいは例数が減少し、いずれも可逆性の変化と考えられた。

以上のように、被験物質投与に関連した変化として、200 mg/kg 以上の投与群の雄雌ともに肝臓の相対重量の高値が認められ、さらに、雄に血液化学的検査における α_2 グロブリン分画比およびALTの有意な高値、雌に血液化学的検査におけるアルブミンおよび総コレステロールの有意な高値が認められた。

1000 mg/kg 投与群では、一般状態でよろめき歩行が雄雌ともに散見され、体重で雄に体重増加抑制、摂餌量で雄雌ともに一過性の低値、尿検査で雄雌ともにpHおよび蛋白の低下ならびに尿量の増加、雌に尿比重の低下、血液学的検査で雌に網赤血球数の高値および活性化トロンボプラスチン時間の延長、血液化学的検査で雄雌ともに総蛋白、 γ -GTPおよびカルシウムの高値、剖検所見で雄雌ともに肝臓の暗褐色化および肥大、器官重量で雄雌の肝臓に重量増加、雄の腎臓に相対重量のみの増加、病理組織学的検査で雄雌ともに肝臓の小葉中心性肝細胞肥大および雄に近位尿細管上皮の硝子滴および好酸性小体(α_{2u} -グロブリン染色陽性)が認められた。

なお、これらの投与期間終了時に認められた変化には、いずれも回復性が認められた。

したがって、本試験条件下における2-クロロハイドロキノンジメチルエーテルの無影響量(NOEL)は雄雌ともに40 mg/kg/dayと考えられた。

参考資料

- 1) 2-クロロハイドロキノンジメチルエーテル, 既存化学物質安全性点検データ, 独立行政法人 製品評価技術基盤機構, (2002)
- 2) 1-クロロ-2,5-ジメトキシベンゼン, 製品安全データシート, 東京化成工業株式会社, (2005/04/24)
- 3) 2-クロロハイドロキノンジメチルエーテルのラットにおける14日間反復経口投与毒性予備試験(SR06112P) 最終報告書, 株式会社 化合物安全性研究所, (2007)

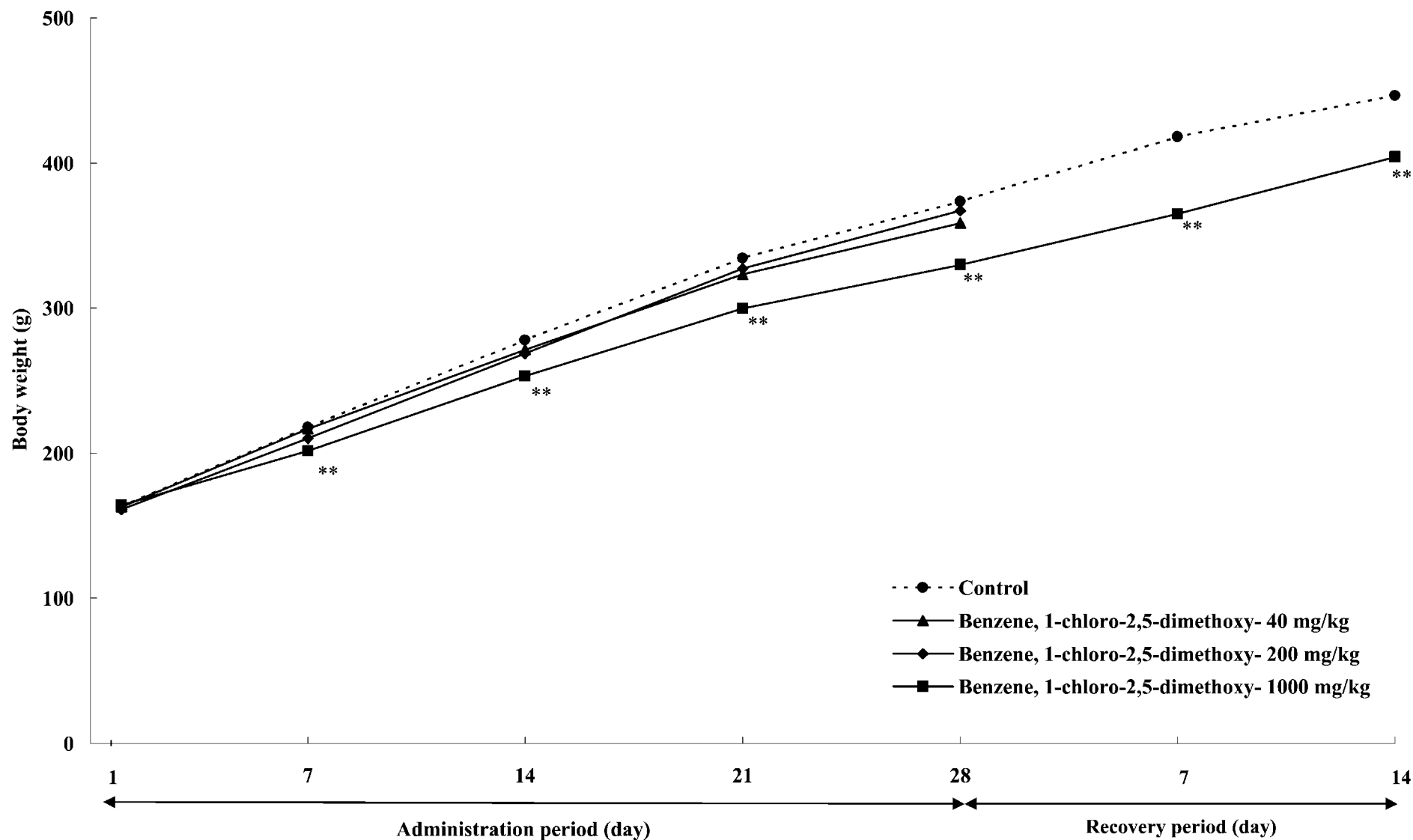


Figure 1 Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

**** :** Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure)

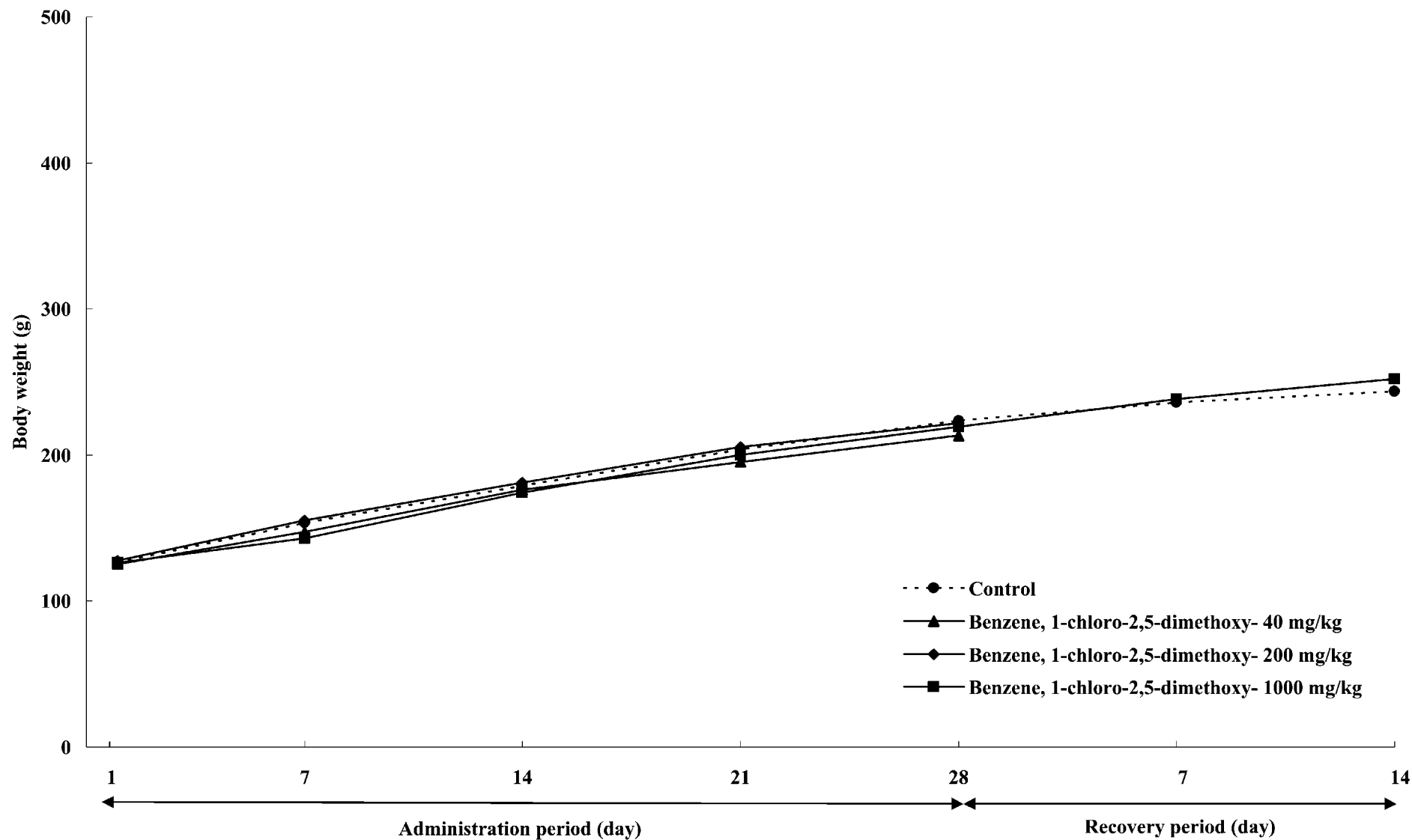


Figure 2 Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

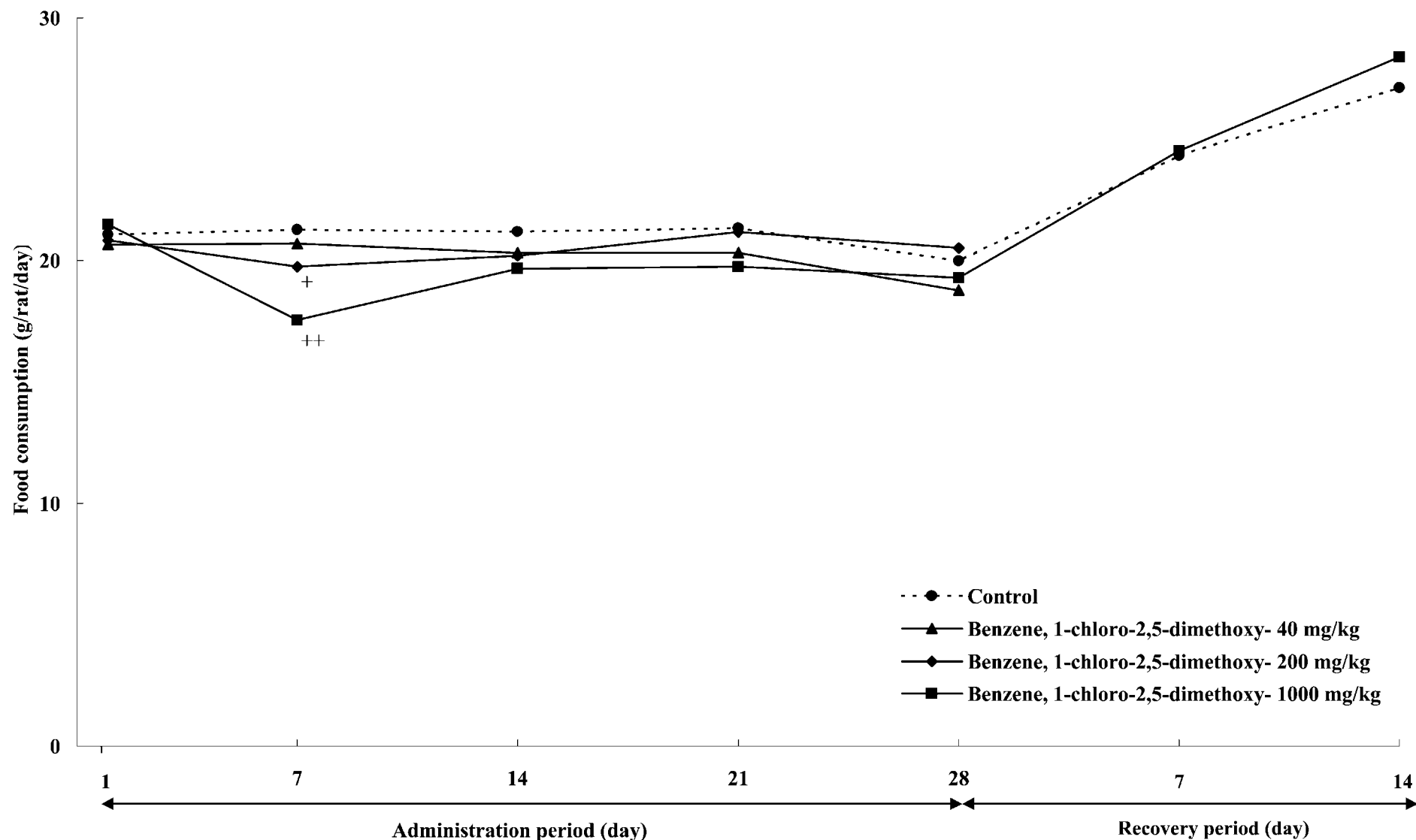


Figure 3 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)
 +,++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05, 0.01$ (Mann-Whitney's U-test)

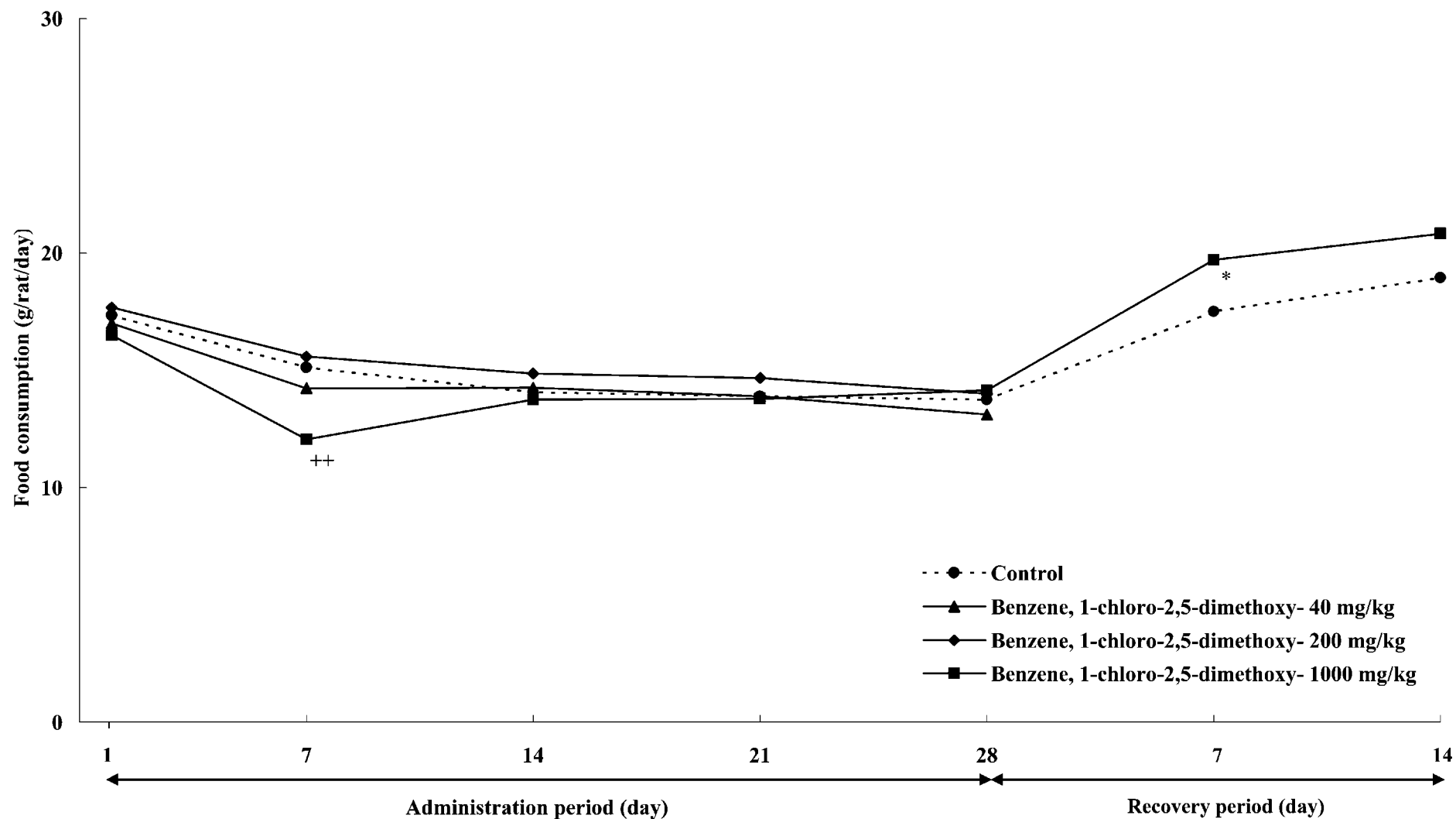


Figure 4 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure)

++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test)

Table 1 General appearance of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Findings	Administration period (day)			Autopsy day	Recovery period (day)	
		1,2	3	4-28		1-14	Autopsy day
Control	Number of animals examined	12	12	12	6	6	6
	No abnormal findings	12	12	12	6	6	6
Benzene, 1-chloro-2,5- dimethoxy- 40 mg/kg	Number of animals examined	6	6	6	6	-	-
	No abnormal findings	6	6	6	6	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5- dimethoxy- 200 mg/kg	Number of animals examined	6	6	6	6	-	-
	No abnormal findings	6	6	6	6	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5- dimethoxy- 1000 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	6	6	6
	No abnormal findings	12	10	12	6	6	6
	Staggering gait	0	2	0	0	0	0

Values are number of animals with findings.

- : Blank value.

Table 2 General appearance of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Findings	Administration period (day)								Autopsy day	Recovery period (day)	Autopsy day
		1-2	3	4	5	6-8	9-11	12	13-28		1-14	
Control	Number of animals examin	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	Number of animals examin	6	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-
	No abnormal findings	6	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	Number of animals examin	6	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-
	No abnormal findings	6	6	6	6	6	6	5	6	6	-	-
	Soil of perigenital fur	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	Number of animals examin	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	6
	No abnormal findings	12	10	11	12	11	12	12	12	6	6	6
	Soil of perigenital fur	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	Staggring gait	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Values are number of animals with findings.

- : Blank value.

Table 3 Detailed clinical observation, in the cage, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Period	Group	Number of animals	Category	Posture 1	Ptosis 1	Respiratory pattern 1	Tremor/ Convulsion 1	Stereotype		Bizarre behavior
								Rolling 0	Circling 0	Selfmutilation 1
Pre	Control	12		12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12
Day 7	Control	12		12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12
Day 14	Control	12		12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12
Day 21	Control	12		12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12
Day 28	Control	12		12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12
R-Day 7	Control	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
R-Day 14	Control	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Table 4 Detailed clinical observation, on the hand, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Period	Group	Number of animals	Handling Category	1	Treating 1	Muscle tone 2	Piloerection 1	Fur 1	Skin 1	Eyes 1	Pupil size 1	Mucous membranes 1	Lacrimation 1	Salivation 1	Body temperature 1
Pre	Control	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 7	Control	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 14	Control	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 21	Control	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 28	Control	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
R-Day 7	Control	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
R-Day 14	Control	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Table 5 Detailed clinical observation, in the open-field, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Period	Group	Number of animals	Convulsion	Gait	Arousal	Urination		Defecation		Stereotype		Bizarre behavior		
										Grooming	Sniffing	Walking backward	Vocaliza- tion	Respiratory pattern
						0	1	0	1	0	1	1	1	1
Pre	Control	12	12	12	12	10	2	8	4	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	6	6	6	4	2	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	6	6	6	5	1	4	2	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	12	12	11	1	7	5	12	12	12	12	12
Day 7	Control	12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	6	6	6	5	1	5	1	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	6	6	6	4	2	5	1	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	12	12	12	0	11	1	12	12	12	12	12
Day 14	Control	12	12	12	12	11	1	11	1	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	6	6	6	3	3	4	2	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	12	12	12	0	11	1	12	12	12	12	12
Day 21	Control	12	12	12	12	11	1	11	1	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	6	6	6	5	1	5	1	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	6	6	6	4	2	4	2	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	12	12	11	1	11	1	12	12	12	12	12
Day 28	Control	12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	6	6	6	4	2	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	12	12	12	0	11	1	12	12	12	12	12
R-Day 7	Control	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
R-Day 14	Control	6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Table 6 Detailed clinical observation, in the cage, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Period	Group	Number of animals	Category	Posture 1	Ptosis 1	Respiratory pattern 1	Tremor/ Convulsion 1	Stereotype		Bizarre behavior
								Rolling 0	Circling 0	Selfmutilation 1
Pre	Control	12		12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12
Day 7	Control	12		12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12
Day 14	Control	12		12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12
Day 21	Control	12		12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12
Day 28	Control	12		12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12
R-Day 7	Control	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6
R-Day 14	Control	6		6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Table 7 Detailed clinical observation, on the hand, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Period	Group	Number of animals	Category	Handling 1	Treating 1	Muscle tone 2	Piloerection 1	Fur		Skin 1	Eyes 1	Pupil size 1	Mucous membranes 1	Lacrimation 1	Salivation 1	Body temperature 1
								1	2							
Pre	Control	12		12	12	12	12	12	0	12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	12	12	12	12	12	12
Day 7	Control	12		12	12	12	12	12	0	12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	12	12	12	12	12	12	12
Day 14	Control	12		12	12	12	12	12	0	12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	12	12	12	12	12	12
Day 21	Control	12		12	12	12	12	12	0	12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	12	12	12	12	12	12
Day 28	Control	12		12	12	12	12	12	0	12	12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	12	12	12	12	12	12
R-Day 7	Control	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
R-Day 14	Control	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Table 8 Detailed clinical observation, in the open-field, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Period	Group	Number of animals	Convulsion 1	Gait 1	Arousal 1					Stereotype		Bizarre behavior		
						Urination		Defecation		Grooming 0	Sniffing 1	Walking backward 1	Vocaliza- tion 1	Respiratory pattern 1
						0	1	0	1					
Pre	Control	12	12	12	12	9	3	12	0	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	12	12	8	4	10	2	12	12	12	12	12
Day 7	Control	12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	6	6	6	4	2	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
Day 14	Control	12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
Day 21	Control	12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
Day 28	Control	12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
R-Day 7	Control	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
R-Day 14	Control	6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Table 9 Functional observation of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Period	Group	Number of animals	Category	Reactivity					Righting reflex
				Visual 4	Touch 2	Auditory 1	Pain 2	Proprioceptive 1	
Week 4	Control	12		12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
R-Week 2	Control	6		6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Week 4 : Week 4 of administration.

R-Week 2 : Week 2 of recovery.

Visual reactivity: approach response.

Touch reactivity: touch response.

Auditory reactivity: response to Galton's whistle.

Pain reactivity: tail pinch response.

Proprioceptive reactivity: returning from enforced posture.

Righting reflex: landing performance from 30 cm above.

Table 10 Functional observation of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Period	Group	Number of animals	Category	Reactivity					Righting reflex
				Visual 4	Touch 2	Auditory 1	Pain 2	Proprioceptive 1	
Week 4	Control	12		12	12	12	12	12	12
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
R-Week 2	Control	6		6	6	6	6	6	6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Week 4 : Week 4 of administration.

R-Week 2 : Week 2 of recovery.

Visual reactivity: approach response.

Touch reactivity: touch response.

Auditory reactivity: response to Galton's whistle.

Pain reactivity: tail pinch response.

Proprioceptive reactivity: returning from enforced posture.

Righting reflex: landing performance from 30 cm above.

Table 11 Grip strength and motor activity measurements of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Period	Group	Number of animals		Grip strength		Motor activity measurements (count)						
				Forelimb (g)	Hindlimb (g)	0'-10'	10'-20'	20'-30'	30'-40'	40'-50'	50'-60'	Total
Week 4	Control	12	Mean	1265.04	427.20	453.1	329.3	217.6	125.5	117.9	93.5	1336.8
			S.D.	106.01	38.28	112.5	75.4	89.4	71.2	61.1	50.8	315.5
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	1190.68	473.83	723.2**	429.8	234.5	183.3	138.7	88.7	1798.2
			S.D.	92.27	55.64	204.5	188.5	66.6	132.6	43.8	87.4	619.7
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	1249.07	442.33	319.2	236.7	98.2*	119.5	58.3	32.2	864.0
			S.D.	132.74	20.22	156.8	103.0	96.2	52.1	29.8	35.1	356.9
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	Mean	1159.53	430.63	424.4	242.4	138.5	80.2	52.8*	43.8	982.1
			S.D.	147.20	58.82	182.7	140.5	80.7	55.2	69.9	46.3	414.2
R-week 2	Control	6	Mean	1541.12	564.57	735.7	481.3	311.8	206.2	156.3	126.5	2017.8
			S.D.	62.70	59.13	156.5	176.0	189.5	86.1	75.8	111.3	497.9
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	1568.67	502.73*	634.0	396.8	258.2	187.7	157.0	127.2	1760.8
			S.D.	86.86	32.55	252.9	156.6	128.3	123.4	151.0	114.1	826.9

Week 4 : Week 4 of administration.

R-week 2 : Week 2 of recovery.

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).

** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).

Table 12 Grip strength and motor activity measurements of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Period	Group	Number of animals		Grip strength		Motor activity measurements (count)						
				Forelimb	Hindlimb	0'-10'	10'-20'	20'-30'	30'-40'	40'-50'	50'-60'	Total
				(g)	(g)							
Week 4	Control	12	Mean	969.59	326.10	723.6	628.3	458.4	333.2	209.5	154.7	2507.6
			S.D.	97.67	29.90	266.7	205.4	166.7	153.6	150.8	134.6	845.0
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	1009.57	312.05	785.2	562.0	457.2	285.0	289.2	320.2	2698.7
			S.D.	109.48	28.69	201.3	195.4	170.3	104.0	89.2	138.6	753.0
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	1005.88	353.95	655.7	453.0	314.8	325.3	316.0	168.7	2233.5
			S.D.	105.28	36.40	253.4	185.0	140.7	205.2	226.3	137.9	1044.6
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	Mean	972.39	330.61	464.5*	396.8*	324.2	238.9	142.6	126.1	1693.1
			S.D.	74.87	37.18	172.6	217.3	169.6	194.5	161.9	219.2	821.6
R-week 2	Control	6	Mean	1190.73	409.57	864.3	697.0	443.2	248.0	303.8	208.0	2764.3
			S.D.	70.21	36.32	143.6	86.8	44.9	74.5	137.1	77.8	216.0
	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	1185.45	396.55	806.5	704.7	552.5	403.2	533.7*	379.7	3380.2
			S.D.	84.45	24.02	238.6	307.7	374.9	220.0	181.6	215.7	1417.3

Week 4 : Week 4 of administration.

R-week 2 : Week 2 of recovery.

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).

Table 13 Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		Body weight (g)					Body weight gain		Body weight (g)		Body weight gain	
			Administration period (day)					1-28		Recovery period (day)		0-14	
			1	7	14	21	28	g	%	7	14	g	%
Control	12	Mean	163.3	217.9	277.9	334.3	373.3	210.0	128.760	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	5.8	9.7	15.0	22.0	28.9	28.7	18.351	418.0	446.5	64.3	16.952
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	162.8	216.8	271.3	323.3	358.7	195.8	120.182	-	-	-	-
		S.D.	4.9	4.7	8.8	17.7	21.5	18.2	9.706	-	-	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	161.2	210.2	268.7	327.2	367.3	206.2	127.940	-	-	-	-
		S.D.	8.3	12.6	16.3	17.5	19.1	11.6	3.880	-	-	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	Mean	164.3	201.6**	253.1**	299.9**	329.8**	165.5**	100.908++	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	5.5	10.5	14.0	19.1	20.0	20.7	13.510	364.7**	404.3**	81.0*	25.140**

Values in parentheses are number of animals.

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).

** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).

++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

- : Blank value.

Table 14 Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		Body weight (g)					Body weight gain		Body weight (g)		Body weight gain	
			Administration period (day)					1-28		Recovery period (day)		0-14	
			1	7	14	21	28	g	%	7	14	g	%
Control	12	Mean	126.5	153.8	179.0	203.9	223.5	97.0	76.636	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	4.5	8.0	10.8	9.9	12.2	9.1	6.063	236.2	243.5	24.0	10.907
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	125.3	147.3	176.3	195.3	213.5	88.2	70.222	-	-	-	-
		S.D.	6.9	12.3	17.4	22.1	26.5	23.3	17.571	-	-	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	127.7	155.3	181.2	205.5	221.8	94.2	73.820	-	-	-	-
		S.D.	4.5	6.5	10.8	10.9	14.0	13.0	10.395	-	-	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	Mean	126.3	143.3	174.2	200.2	219.2	92.8	73.446	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	4.7	16.7	14.7	12.5	13.5	10.7	7.524	238.5	252.2	28.8	12.960

Values in parentheses are number of animals.

- : Blank value.

Table 15 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals	Food consumption (g/rat/day)							
		Administration period (day)					Recovery period (day)		
			1	7	14	21	28	7	14
Control	12	Mean	21.08	21.28	21.20	21.33	19.99	(6) 24.33	(6) 27.13
		S.D.	1.38	1.33	1.31	1.72	2.45	2.67	2.31
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	20.67	20.70	20.32	20.32	18.78	-	-
		S.D.	0.52	0.77	0.42	0.93	1.29	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	20.83	19.75+	20.20	21.18	20.52	-	-
		S.D.	1.33	0.91	0.97	1.25	1.13	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	Mean	21.50	17.54++	19.67	19.76	19.28	(6) 24.53	(6) 28.40
		S.D.	1.45	2.47	1.95	1.88	2.35	1.81	2.18

Values in parentheses are number of animals.

+ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

- : Blank value.

Table 16 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals	Food consumption (g/rat/day)							
		Administration period (day)					Recovery period (day)		
		1	7	14	21	28	7	14	
Control	12	Mean	17.33	15.11	14.06	13.88	13.74	(6) 17.50	(6) 18.93
		S.D.	1.23	0.99	1.20	1.12	1.13	1.24	1.07
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	17.00	14.22	14.25	13.88	13.10	-	-
		S.D.	2.61	1.48	1.58	1.58	2.14	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	17.67	15.58	14.87	14.67	14.00	-	-
		S.D.	1.03	1.07	1.01	1.41	2.26	-	-
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	Mean	16.50	12.05++	13.74	13.78	14.14	(6) 19.70*	(6) 20.83
		S.D.	1.73	4.11	2.12	0.94	1.42	1.78	1.86

Values in parentheses are number of animals.

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).

++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

- : Blank value.

Table 17 Urinary findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals	pH						Protein				Glucose -	Ketone body -	Urobilinogen 0.1 EU/dL	Bilirubin -
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++				
Control	12	0	0	1	0	1	10	0	0	4	8	12	12	12	12
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	1	0	0	0	0	5	0	0	4	2	6	6	6	6
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	1	0	0	1	2	2	0	0	5	1	6	6	6	6
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	[0	5	0	3	4	0]++	[0	2	9	1]++	12	12	12	12

Group	Number of animals	Occult blood		Color A	Specific gravity					Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
		-	±		1.011- 1.020	1.021- 1.030	1.031- 1.040	1.041- 1.050	1.051≤	
Control	12	12	0	12	1	1	0	6	4	10.04 ± 8.27
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	4	2	6	0	0	0	2	4	6.67 ± 1.40
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	5	1	6	0	0	1	3	2	9.08 ± 2.58
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	11	1	12	0	0	4	3	5	14.79 ± 4.69++

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, + ; Moderate, ++ ; Severe.

Color : A; Pale yellow or yellow.

++ or []++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 18 Urinary findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals	pH						Protein				Glucose -	Ketone body -	Urobilinogen 0.1 EU/dL	Bilirubin -
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++				
Control	12	0	0	1	2	2	7	2	5	4	1	12	12	12	12
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	0	1	0	1	1	3	1	1	3	1	6	6	6	6
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	1	1	0	0	2	2	2	2	1	1	6	6	6	6
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	[0	1	4	4	2	1]++	[10	1	1	0]++	12	12	12	12

Group	Number of animals	Occult blood					Color A	Specific gravity						Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
		-	±	+	++	+++		1.000- 1.011- 1.021- 1.031- 1.041- 1.051 ≤						
								0.010	1.020	1.030	1.040	1.050		
Control	12	11	1	0	0	0	12	0	0	0	3	7	2	6.42 ± 1.78
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	5	0	0	0	1	6	0	0	0	1	4	1	6.17 ± 2.66
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	2	3	1	7.25 ± 2.58
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	12	12	0	0	0	0	12	[2	4	2	1	3	0]	++ 38.46 ± 27.29++

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, + ; Moderate, ++ ; Severe, +++ ; Very severe.

Color : A; Pale yellow or yellow.

++ or []++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 19 Urinary findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals	pH		Protein				Glucose	Ketone body	Urobilinogen	Bilirubin	Occult blood	
		8.0	8.5	-	±	+	++					-	±
Control	6	0	6	0	0	4	2	6	6	6	6	5	1
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	1	5	0	1	5	0	6	6	6	6	5	1

Group	Number of animals	Color A	Specific gravity			Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
			1.031- 1.040	1.041- 1.050	1.051 ≤	
Control	6	6	2	2	2	13.08 ± 4.57
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	6	2	2	2	13.50 ± 2.85

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, + ; Moderate, ++ ; Severe.

Color : A; Pale yellow or yellow.

Table 20 Urinary findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals	pH					Protein			Glucose	Ketone body	Urobilinogen 0.1 EU/dL	Bilirubin	Occult blood
		6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+					
Control	6	1	0	0	1	4	2	4	0	6	6	6	6	6
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	0	0	0	2	4	1	4	1	6	6	6	6	6

Group	Number of animals	Color A	Specific gravity					Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
			1.011-1.020	1.021-1.030	1.031-1.040	1.041-1.050	1.051≤	
Control	6	6	0	0	4	1	1	12.33 ± 4.24
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	6	1	1	3	0	1	22.92 ± 12.12

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, + ; Moderate.

Color : A; Pale yellow or yellow.

Table 21 Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		RBC 10 ⁴ /μL	Ht %	Hb g/dL	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	WBC 10 ² /μL	Platelet 10 ⁴ /μL
Control	6	Mean	810.5	47.90	16.82	59.08	20.78	35.13	143.8	120.42
		S.D.	47.0	2.95	0.75	1.31	0.55	0.61	60.1	10.53
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	797.7	46.35	16.48	58.13	20.68	35.57	134.7	114.58
		S.D.	29.0	1.35	0.48	1.68	0.53	0.46	36.6	10.15
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	791.0	46.28	16.38	58.57	20.73	35.43	147.0	120.38
		S.D.	45.4	2.45	0.66	2.28	0.55	0.82	44.0	8.97
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	809.8	47.73	16.77	58.95	20.72	35.15	128.7	124.15
		S.D.	22.1	1.35	0.34	1.78	0.54	0.50	25.0	15.30

Group	Number of animals		Reticulo-cyte ‰	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						Lympho-cyte	Others
						Neutrophil		Eosinophil	Basophil	Monocyte			
						Stab form	Segmented						
Control	6	Mean	28.8	17.38	23.67	0.93	9.13	0.53	0.00	2.47	86.93	0.00	
		S.D.	5.0	1.86	2.32	0.41	3.23	0.55	0.00	1.35	4.31	0.00	
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	29.2	17.72	27.50	0.53	11.67	0.73	0.00	1.67	85.40	0.00	
		S.D.	8.3	2.48	2.10	0.21	3.61	0.73	0.00	0.85	4.25	0.00	
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	28.7	18.90	26.88	0.80	10.33	0.53	0.00	1.53	86.80	0.00	
		S.D.	7.3	0.98	4.06	0.44	3.91	0.48	0.00	0.59	4.23	0.00	
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	32.3	16.40	27.12	0.60	10.67	0.13	0.00	2.80	85.80	0.00	
		S.D.	5.9	2.04	2.63	0.55	2.50	0.21	0.00	0.98	3.53	0.00	

Table 22 Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		RBC 10 ⁴ /μL	Ht %	Hb g/dL	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	WBC 10 ² /μL	Platelet 10 ⁴ /μL
Control	6	Mean	746.7	42.28	15.42	56.62	20.67	36.45	97.7	124.32
		S.D.	38.8	2.05	0.80	0.64	0.18	0.41	23.7	16.37
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	777.0	43.50	15.97	56.02	20.57	36.70	75.3	124.45
		S.D.	18.2	0.64	0.28	1.06	0.49	0.20	11.7	16.12
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	770.5	43.30	15.95	56.20	20.70	36.83	100.7	128.03
		S.D.	16.3	1.30	0.41	1.20	0.37	0.29	25.6	6.68
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	773.3	44.43	16.02	57.48	20.72	36.05	104.5	117.95
		S.D.	13.2	1.63	0.50	2.40	0.69	0.59	23.3	10.05

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						Lympho-cyte	Others
						Neutrophil		Eosinophil	Basophil	Monocyte			
						Stab form	Segmented						
Control	6	Mean	25.2	17.05	19.55	0.87	14.87	0.80	0.00	1.87	81.60	0.00	
		S.D.	4.5	0.37	1.53	0.47	6.62	1.01	0.00	1.42	6.97	0.00	
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	23.7	16.92	19.98	1.00	13.00	1.00	0.00	1.73	83.27	0.00	
		S.D.	5.6	0.98	1.72	0.79	4.96	0.83	0.00	0.65	6.14	0.00	
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	25.3	17.32	21.07	1.07	9.73	0.20	0.00	2.07	86.93	0.00	
		S.D.	3.3	0.62	0.88	0.48	3.20	0.33	0.00	0.59	3.15	0.00	
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	32.5*	16.98	22.92**	0.87	11.93	0.47	0.00	2.47	84.27	0.00	
		S.D.	2.2	0.46	1.49	1.20	7.86	0.59	0.00	1.03	8.27	0.00	

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).

Table 23 Hematological findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		RBC 10 ⁴ /μL	Ht %	Hb g/dL	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	WBC 10 ² /μL	Platelet 10 ⁴ /μL
Control	6	Mean	858.3	47.08	17.12	54.88	19.95	36.35	168.0	119.43
		S.D.	31.8	1.14	0.56	1.05	0.62	0.76	34.6	17.09
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	837.2	46.13	16.68	55.20	19.95	36.20	156.8	114.88
		S.D.	37.2	2.16	0.44	3.48	0.92	0.90	28.7	11.12

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						
						Neutrophil		Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lympho-cyte	Others
						Stab form	Segmented					
Control	6	Mean	24.7	19.93	26.17	0.60	5.33	0.53	0.00	0.73	92.80	0.00
		S.D.	4.5	3.52	2.81	0.42	1.78	0.33	0.00	0.53	2.32	0.00
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	31.7	18.08	25.40	0.67	9.47*	0.47	0.00	0.87	88.53*	0.00
		S.D.	7.9	1.59	1.63	0.48	2.92	0.39	0.00	0.53	3.17	0.00

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).

Table 24 Hematological findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		RBC 10 ⁴ /μL	Ht %	Hb g/dL	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	WBC 10 ² /μL	Platelet 10 ⁴ /μL
Control	6	Mean	816.5	44.20	16.28	54.15	19.95	36.85	97.7	113.75
		S.D.	38.3	1.99	0.65	0.84	0.61	0.60	32.3	5.50
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	788.0	42.88	15.90	54.45	20.18	37.07	92.0	120.30
		S.D.	33.8	1.50	0.63	1.94	0.70	0.38	17.8	8.07

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC %						
						Neutrophil		Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lympho-cyte	Others
						Stab form	Segmented					
Control	6	Mean	24.3	17.83	18.93	1.00	7.60	0.53	0.00	0.47	90.40	0.00
		S.D.	3.1	0.77	0.97	0.70	3.55	0.55	0.00	0.30	4.12	0.00
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	29.2**	16.62**	20.72*	0.60	9.07	0.67	0.00	0.47	89.20	0.00
		S.D.	1.9	0.44	1.16	0.49	4.00	0.94	0.00	0.30	5.02	0.00

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).

Table 25 Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							α_1	α_2	β	γ					
Control	6	Mean	5.38	2.967	1.233	55.17	19.62	7.20	15.07	2.95	58.7	24.3	684.7	0.45	0.060
		S.D.	0.15	0.090	0.056	1.20	1.74	0.33	1.07	0.44	3.8	1.5	124.0	0.33	0.013
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	5.45	3.028	1.253	55.55	18.55	7.67	15.50	2.73	63.7	23.5	821.5	0.53	0.057
		S.D.	0.18	0.146	0.060	1.13	1.76	0.83	0.37	0.58	6.2	0.8	170.0	0.12	0.012
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	5.38	2.872	1.153	53.35	18.97	8.42**	16.35	2.92	59.2	28.0+	729.8	0.62	0.055
		S.D.	0.16	0.223	0.159	3.55	1.49	0.71	1.89	0.56	3.1	2.2	123.2	0.28	0.010
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	5.87**	2.998	1.047*	51.10++	18.03	10.83**	17.53+	2.50	52.2*	40.2++	570.3	2.22++	0.058
		S.D.	0.32	0.202	0.097	2.33	1.28	0.49	1.37	0.39	2.8	6.6	119.1	0.88	0.010

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
Control	6	Mean	164.0	58.0	50.3	10.08	0.493	144.0	5.268	106.0	9.92	8.83
		S.D.	17.2	5.1	17.8	0.73	0.032	2.0	0.157	2.3	0.31	0.58
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	158.5	60.7	32.7	9.18	0.495	144.3	5.080	105.8	9.92	8.98
		S.D.	8.6	8.0	10.1	1.76	0.023	1.2	0.164	1.6	0.23	0.57
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	169.3	62.8	47.0	9.25	0.492	143.8	5.162	106.2	9.72	9.52
		S.D.	16.4	7.1	12.4	1.01	0.017	1.2	0.265	1.3	0.22	0.87
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	148.8	97.8++	47.5	9.43	0.535*	143.7	5.115	104.2	10.50**	10.10**
		S.D.	25.7	20.9	34.7	0.89	0.024	1.0	0.231	1.0	0.27	0.38

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).+ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 26 Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							α_1	α_2	β	γ					
Control	6	Mean	5.52	3.143	1.333	57.07	16.97	7.25	15.05	3.67	65.0	22.2	446.8	0.50	0.058
		S.D.	0.37	0.131	0.130	2.22	1.88	0.36	0.88	1.07	15.6	4.1	43.2	0.17	0.012
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	5.65	3.295	1.403	58.35	17.28	6.92	14.18	3.27	61.3	20.8	442.7	0.47	0.065
		S.D.	0.31	0.147	0.066	1.13	1.14	0.47	0.71	0.38	2.4	2.1	104.3	0.16	0.010
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	5.93	3.482*	1.422	58.68	15.70	7.07	14.75	3.80	54.5	23.5	459.3	0.62	0.063
		S.D.	0.29	0.214	0.111	1.92	1.63	0.75	1.09	0.70	3.1	2.2	113.3	0.10	0.016
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	6.32**	3.558**	1.295	56.33	15.27	9.18**	15.20	4.02	50.3++	37.0**	547.8	2.32++	0.067
		S.D.	0.29	0.231	0.104	2.02	1.35	1.01	0.97	1.34	2.0	5.9	141.0	1.08	0.016

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
Control	6	Mean	130.0	61.5	13.8	10.50	0.522	143.5	4.677	105.8	9.83	7.78
		S.D.	12.4	9.5	7.3	1.01	0.020	1.2	0.191	0.8	0.20	0.26
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	127.5	57.2	12.2	12.00	0.523	144.0	4.788	107.2	9.93	7.58
		S.D.	16.8	7.5	9.5	1.09	0.025	0.6	0.243	1.5	0.16	0.38
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	132.7	73.3++	15.8	13.03	0.520	144.8	4.498	106.8	10.08	7.38
		S.D.	17.2	4.4	13.7	2.34	0.044	1.2	0.259	0.8	0.19	0.59
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	143.8	127.3++	22.0	11.27	0.525	143.7	4.712	106.7	10.65**	8.60
		S.D.	21.0	20.6	9.3	2.66	0.041	1.4	0.490	1.5	0.34	1.13

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 27 Biochemical findings of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	γ-GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							α ₁	α ₂	β	γ					
Control	6	Mean	5.77	2.937	1.045	51.02	22.83	6.67	15.17	4.32	63.0	24.2	490.0	0.60	0.053
		S.D.	0.10	0.094	0.095	2.20	2.07	0.43	0.64	0.46	4.6	3.3	110.2	0.18	0.010
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	5.80	2.997	1.068	51.68	22.32	6.95	14.97	4.08	60.3	26.7	394.7	0.82	0.065
		S.D.	0.14	0.053	0.039	0.85	1.61	0.64	0.65	0.63	4.7	3.6	65.9	0.17	0.015

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
Control	6	Mean	186.3	62.3	56.7	12.85	0.547	142.5	4.692	104.2	9.62	7.73
		S.D.	13.7	16.0	24.6	1.26	0.031	2.7	0.307	1.9	0.25	0.51
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	162.7*	70.8	34.3	13.82	0.510	143.2	4.592	104.3	9.77	8.68**
		S.D.	20.1	6.1	18.4	1.25	0.030	1.9	0.163	1.6	0.21	0.31

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).

Table 28 Biochemical findings of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							α_1	α_2	β	γ					
Control	6	Mean	6.17	3.355	1.192	54.37	19.32	6.25	14.47	5.60	59.3	21.2	298.3	0.95	0.080
		S.D.	0.21	0.167	0.074	1.58	0.95	0.34	0.59	0.77	2.2	2.6	47.0	0.28	0.011
Benzene, 1-chloro-2,5- dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	6.25	3.335	1.147	53.40	20.65	6.53	14.57	4.85	54.2	18.8	232.5*	0.72	0.072
		S.D.	0.27	0.203	0.051	1.10	1.97	0.48	0.79	0.62	8.8	3.7	42.0	0.19	0.018

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
Control	6	Mean	140.2	69.3	13.8	15.37	0.570	143.5	4.383	106.3	9.75	6.35
		S.D.	9.8	8.2	11.5	1.81	0.022	1.5	0.127	2.0	0.12	0.40
Benzene, 1-chloro-2,5- dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	154.8*	98.0**	20.3	14.78	0.565	142.5	4.558	105.7	9.78	6.48
		S.D.	9.1	12.8	12.7	2.22	0.039	1.0	0.340	0.8	0.26	0.64

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).

** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).

Table 29 Gross findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

	End of administration				End of recovery	
	Control	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (mg/kg)			Control	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (mg/kg)
		40	200	1000		1000
Number of animals examined	6	6	6	6	6	6
No abnormal findings	6	6	6	0	6	6
Liver : Dark brown discoloration	0	0	0	6	0	0
Hypertrophy	0	0	0	3	0	0
Testis : Hypertrophy, unilateral	0	0	0	1	0	0

Values are expressed as the number of animals.

Table 30 Gross findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

	End of administration				End of recovery	
	Control	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (mg/kg)			Control	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (mg/kg)
		40	200	1000		1000
Number of animals examined	6	6	6	6	6	6
No abnormal findings	6	6	6	0	6	5
Liver : Dark brown discoloration	0	0	0	6	0	1
Hypertrophy	0	0	0	2	0	0
Intra-thoracic organs : Adhesion	0	0	0	1	0	0

Values are expressed as the number of animals.

Table 31 Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
Control	6	Mean	341.2	10.907	3.192	2.600	0.768	0.603	0.175	1.215	0.357	2.073	0.612	10.40	3.065
		S.D.	34.2	1.397	0.177	0.193	0.079	0.111	0.019	0.066	0.023	0.078	0.046	0.85	0.251
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	337.2	10.957	3.248	2.653	0.787	0.580	0.172	1.190	0.350	2.103	0.623	11.25	3.342
		S.D.	20.9	0.919	0.133	0.257	0.044	0.126	0.029	0.101	0.014	0.083	0.030	0.96	0.258
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	342.3	12.572	3.665**	2.708	0.792	0.642	0.188	1.237	0.360	2.052	0.598	11.28	3.295
		S.D.	19.5	1.226	0.177	0.246	0.038	0.136	0.045	0.136	0.022	0.109	0.029	1.02	0.183
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	308.3	16.365**	5.298**	2.895	0.933**	0.557	0.178	1.158	0.373	2.043	0.665	10.68	3.478
		S.D.	21.5	1.945	0.364	0.458	0.093	0.095	0.025	0.163	0.031	0.095	0.052	0.97	0.388

Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Testis		Epididymis		Prostate		Seminal vesicle	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	g	%
Control	6	Mean	550.0	160.757	17.85	5.343	48.3	14.252	3.105	0.918	0.812	0.238	410.2	122.827	1.250	0.368
		S.D.	130.2	31.072	4.65	1.783	6.9	2.174	0.119	0.097	0.095	0.033	63.0	32.794	0.218	0.058
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	536.7	158.227	13.48	4.017	50.3	14.918	3.015	0.897	0.732	0.217	365.0	107.862	1.145	0.342
		S.D.	104.9	23.712	1.06	0.443	5.9	1.296	0.152	0.080	0.052	0.032	68.6	16.353	0.169	0.059
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	583.2	169.463	15.37	4.483	52.0	15.192	2.995	0.877	0.717	0.208	389.2	113.423	1.115	0.325
		S.D.	149.2	38.560	2.64	0.659	4.4	1.013	0.304	0.105	0.106	0.033	106.5	29.361	0.276	0.076
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	544.0	177.165	14.73	4.747	51.0	16.577*	3.540	1.160+	0.703	0.227	294.8*	95.773	0.993	0.325
		S.D.	64.3	24.676	3.12	0.741	4.4	1.422	0.743	0.302	0.070	0.018	58.9	18.655	0.144	0.062

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).+ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney test).

Table 32 Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
Control	6	Mean	217.2	7.112	3.270	1.722	0.793	0.478	0.220	0.822	0.378	1.942	0.898	12.92	5.952
		S.D.	11.1	0.591	0.143	0.126	0.035	0.105	0.044	0.096	0.029	0.089	0.067	1.23	0.533
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	201.8	6.500	3.217	1.602	0.798	0.397	0.198	0.765	0.382	1.907	0.955	12.78	6.348
		S.D.	24.7	1.016	0.206	0.163	0.075	0.029	0.023	0.095	0.043	0.041	0.107	2.72	1.154
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	208.5	7.638	3.657**	1.675	0.805	0.450	0.215	0.780	0.373	1.948	0.937	13.67	6.548
		S.D.	12.4	0.749	0.206	0.102	0.048	0.050	0.026	0.053	0.030	0.060	0.047	2.27	0.962
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	198.2	10.533**	5.312**	1.662	0.838	0.418	0.212	0.775	0.392	1.868	0.943	12.37	6.260
		S.D.	9.1	0.664	0.191	0.158	0.076	0.018	0.012	0.058	0.034	0.062	0.053	1.33	0.799

Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Ovary		Uterus	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%
Control	6	Mean	469.3	214.080	13.12	6.050	64.5	29.725	79.3	36.585	0.568	0.260
		S.D.	133.5	51.495	2.96	1.352	6.2	2.711	12.0	5.550	0.218	0.097
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 40 mg/kg	6	Mean	413.2	202.315	13.32	6.607	61.0	30.630	85.7	42.322	0.472	0.235
		S.D.	110.5	35.554	2.74	1.128	8.0	5.679	18.7	7.020	0.086	0.048
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 200 mg/kg	6	Mean	489.5	234.485	14.28	6.855	58.8	28.342	86.7	41.570	0.510	0.245
		S.D.	93.3	41.678	2.94	1.374	4.8	3.251	14.2	6.329	0.141	0.073
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	473.8	240.270	14.25	7.188	53.7*	27.157	81.3	41.032	0.428	0.217
		S.D.	96.1	54.586	2.95	1.419	6.8	3.789	16.2	7.729	0.124	0.063

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).

Table 33 Absolute and relative organ weights of male rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
Control	6	Mean	415.0	12.895	3.100	2.923	0.703	0.690	0.167	1.437	0.345	2.142	0.517	11.60	2.802
		S.D.	20.7	1.631	0.300	0.202	0.020	0.108	0.027	0.100	0.012	0.080	0.021	2.35	0.576
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	373.0**	12.022	3.220	2.857	0.767**	0.720	0.193	1.222++	0.328*	2.082	0.557*	13.02	3.492
		S.D.	12.7	0.740	0.130	0.091	0.042	0.081	0.023	0.035	0.010	0.081	0.036	0.70	0.195

Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Testis		Epididymis		Prostate		Seminal vesicle	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	g	%
Control	6	Mean	543.8	131.605	18.93	4.555	54.8	13.253	3.192	0.768	1.018	0.247	526.3	126.822	1.460	0.350
		S.D.	133.2	35.272	3.19	0.677	9.7	2.511	0.205	0.050	0.056	0.022	119.2	27.985	0.240	0.052
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	572.5	153.747	19.15	5.135	57.0	15.302	3.398	0.910**	1.070	0.287	478.7	128.268	1.592	0.427*
		S.D.	153.0	40.877	1.64	0.411	2.8	0.957	0.242	0.067	0.140	0.041	73.2	18.798	0.171	0.044

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).** : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's procedure).++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney test).

Table 34 Absolute and relative organ weights of female rats in 14-day recovery test following 28-day repeated oral dose of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
Control	6	Mean	228.5	6.377	2.790	1.632	0.715	0.430	0.190	0.822	0.360	1.993	0.875	13.25	5.793
		S.D.	12.3	0.380	0.092	0.091	0.043	0.030	0.023	0.060	0.011	0.031	0.036	3.84	1.617
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	232.5	8.090++	3.477++	1.748	0.753	0.505*	0.218	0.912*	0.392*	1.950	0.840	14.22	6.113
		S.D.	16.6	1.030	0.342	0.198	0.061	0.067	0.026	0.052	0.024	0.042	0.050	3.42	1.459

Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Ovary		Uterus	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%
Control	6	Mean	406.8	179.027	13.87	6.075	63.2	27.663	83.7	36.678	0.453	0.198
		S.D.	37.1	24.019	0.81	0.352	8.1	3.327	8.2	3.787	0.141	0.055
Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- 1000 mg/kg	6	Mean	481.0*	207.298	16.18	7.017	64.7	27.883	91.3	39.370	0.608	0.267
		S.D.	62.4	27.507	4.26	2.005	5.7	2.688	13.1	5.674	0.231	0.110

* : Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's procedure).

++ : Significantly different from the control group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney test).

Table 35 Histopathological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

		End of administration				End of recovery	
		Control	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (mg/kg)			Control	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (mg/kg)
			40	200	1000		1000
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
Organ: Findings	Grade						
Lung: Fibrosis, focal	+	0	-	-	1	0	0
Mineralization, artery	+	0	-	-	0	1	2
Liver: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+	0	0	0	6	0	0
Fatty change, periportal	+	1	0	0	0	0	0
Microgranuloma	+	3	0	3	3	2	6
Heart: Myocardial degeneration, focal	+	0	-	-	0	1	1
Kidney: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	+	0	0	0	6	3	2
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	+	0	0	0	6	3	5
Regeneration, tubular epithelium	+	4	0	0	2	1	4
Cast, hyaline	+	0	1	0	0	0	0
Cyst	+	2	0	0	0	0	0
Fibrosis, focal	+	0	0	0	0	1	0
Testis: Dilatation, seminiferous tubule	+	0	-	-	1	0	0
Prostate: Cellular infiltration, inflammatory cell	+	0	-	-	0	1	3
Pituitary gland: Cyst, pars distalis	+	0	-	-	0	1	0

Values are number of animals with findings.

-: Blank value.

Grade; +: slight change.

Table 36 Histopathological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (SR06112)

		End of administration				End of recovery	
		Control	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (mg/kg)			Control	Benzene, 1-chloro-2,5-dimethoxy- (mg/kg)
			40	200	1000		1000
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
Organ: Findings	Grade						
Lung: Accumulation, foamy cell	+	1	-	-	0	1	0
Mineralization, artery	+	1	-	-	0	2	0
Metaplasia, osseous	+	1	-	-	0	0	0
Granulomatous inflammation, foreign body, pleura	+++	0	-	-	1	0	0
Esophagus: Granuloma, foreign body, adventitia	+	0	-	-	1	0	0
Liver: Hyperplasia, hepatocyte, centrilobular	+	0	0	0	6	0	1
Fatty change, periportal	+	5	2	0	0	0	0
Microgranuloma	+	4	3	3	2	4	4
Heart: Inflammation, epicardium	+	0	-	-	1	0	0
Kidney: Regeneration, tubular epithelium	+	1	0	0	2	1	0
Fibrosis, focal	+	0	1	0	1	0	0
Thymus: Granuloma, foreign body, capsule	+	0	-	-	1	0	0
Parietal pleura: Granulomatous inflammation, foreign body	+++	-	-	-	1 (1)	-	-

Values are number of animals with findings.

Values in parentheses are number of animals examined.

-: Blank value.

Grade; +: slight change, +++: severe change.