

食薬セ研第10-1633号

2000年 8月25日

1,1-ビス[*tert*-ブチルパーオキシ]-
3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの
ラットを用いる
28日間反復経口投与毒性試験（回復14日間）

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】

	頁
要 約	1
緒 言	3
方 法	4
1. 被験物質	4
2. 使用動物および飼育方法	4
3. 投与検体の調製	5
4. 群および群分け	5
5. 投与方法	6
6. 検査項目	6
7. データ解析法	9
結 果	10
1. 死亡例	10
2. 一般状態	10
3. 体重	10
4. 摂餌量	10
5. 尿検査所見	10
6. 血液学検査所見	11
7. 生化学検査所見	11
8. 病理学検査所見	12
考 察	14
文 献	18
Figures 1~2	19
Tables 1~11	22

【要 約】

1,1-ビス[*tert*-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの28日間反復経口投与毒性試験（回復14日間）を雌雄の Sprague-Dawley 系ラットを用いて実施した。雌雄とも4群構成とし、1群には媒体であるコーン油を、他の3群には被験物質を、それぞれ100、300 および 1000 mg/kg の用量で28日間にわたり強制経口投与した。雌雄とも回復試験に用いる動物を含む対照群および 1000 mg/kg 投与群は各10匹、その他の群は各5匹とした。今回の試験において認められた主な変化を以下に要約する。

投与期間中に死亡例はみられなかったが、回復第2日に 1000 mg/kg 投与群の雄1例で後肢が麻痺し、歩行不能状態となり、鼻周囲の褐色の汚れ、血尿と考えられる赤色尿の排泄、立毛が観察され、回復第3日に死亡した。その他の一般状態の変化としては、投与第2日以降、雄では 300 mg/kg 以上の投与群、雌では 100 mg/kg 以上の投与群で、投与後1時間以内に消失する一過性の流涎が認められた。また、1000 mg/kg 投与群の雌雄で投与第1週ないし2週の摂餌量が、対照群と比較して有意な低値を示したが、この他には、体重および摂餌量のいずれにも差は認められなかった。

血液学検査では、1000 mg/kg 投与群の雌雄でプロトロンビン時間の有意な延長あるいは延長傾向と活性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。さらに、1000 mg/kg 投与群の雌では、血色素量の有意な減少がみられたが、骨髓像には、雌雄とも対照群と比較して著しい差は認められなかった。回復試験期間終了時の検査では、被験物質投与群の雌の血色素量に有意な減少が認められたほか、被験物質投与群では、ヘマトクリット値の有意な減少が雌雄に、また、平均赤血球血色素濃度の有意な上昇が雄に認められた。一方、投与期間終了時にみられた血液凝固時間の延長は、雌雄とも認められなかった。

生化学検査では、1000 mg/kg 投与群において、ブドウ糖濃度の有意な低下が雄に、GPT 活性の有意な上昇が雌雄に、 γ -GTP 活性の有意な上昇が雌にそれぞれ認められた。また、雌では、総蛋白濃度の有意な上昇が 1000 mg/kg 投与群に、アルブミン濃度の有意な低下が 100 mg/kg 投与群にそれぞれ認められ、被験物質投与群では、いずれも A/G 比が有意な低値を示した。さらに、300 mg/kg 以上の投与群では、雌で総コレステロール濃度の有意な上昇がみられ、雄でトリグリセライド濃度の有意な低下が認められた。回復試験期間終了時の検査では、A/G 比が被験物質投与群の雄で有意な低値を示し、雌で

もその値は対照群と比較して低い傾向にあったが、投与期間終了時にみられた他の変化は認められなかった。

器官重量では、雌雄とも用量に依存して肝臓および腎臓の重量が増加した。その他、雌の被験物質投与群では、いずれも副腎の絶対重量に有意な増加がみられ、相対重量においても有意な増加あるいは増加傾向が認められた。また、回復試験期間終了時の被験物質投与群でも、雌雄の肝臓および腎臓の相対重量に有意な増加が認められた。

投与期間終了時の主な剖検所見としては、1000 mg/kg 投与群の一部の例に、肝臓の暗色化、大型化あるいは小葉像の明瞭化が観察された。組織学検査では、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が、雄では 300 mg/kg 以上、雌では 100 mg/kg 以上の投与群に観察され、用量に依存してその程度が増強した。さらに、肝臓の門脈周囲性の脂肪化が雌では用量に依存して増強した。腎臓では、雄の被験物質投与群の全例に、近位尿細管の好酸性細胞質内封入体と好酸性小体が観察され、好酸性細胞質内封入体の程度は用量に依存して増強した。副腎では、雌の被験物質投与群の多くの例に束状帯細胞の細胞質肥大が観察された。回復試験期間終了時には、腎臓の好塩基性尿細管が雄の被験物質投与群で増え、その程度も増強したが、投与期間終了時にみられた他の変化は消失あるいは軽減する傾向にあった。回復第3日の死亡例の主な所見としては、投与期間終了時と同様な所見に加え、脳および脊髄の硬膜下、膀胱、胸腺、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節の出血のほか、精巣、精巣上体、前立腺の間質に出血が認められた。

以上のように、1,1-ビス[*tert*-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの反復投与により、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が雌では 100 mg/kg 以上、雄では 300 mg/kg 以上の用量でみられ、雌ではさらに 100 mg/kg 以上の用量で門脈周囲性の脂肪化の程度が増強したほか、A/G 比の低下が認められた。この他、肝臓に関連する所見として、1000 mg/kg の用量では、雌雄で血液凝固時間の延長、GPT 活性の上昇等が認められ、肝障害作用が示唆された。また、肝臓の他に、雄では 100 mg/kg 以上の用量で腎臓の近位尿細管に好酸性細胞質内封入体が出現し、腎毒性が示唆され、さらに、雌では 100 mg/kg 以上の用量で副腎の束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。これらのことから、本試験条件下における 1,1-ビス[*tert*-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの無影響量は雌雄とも 100 mg/kg 未満であると考えられる。

【緒 言】

1,1-ビス[*tert*-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン（以下、BPTCと略記）は、不飽和ポリエステル樹脂の加熱硬化用触媒、天然ゴムや合成ゴムをはじめとするアルファオレフィンポリマー・コポリマーの架橋剤、スチレン等の重合触媒として工業的に使用されているフリーラジカル触媒である。

BPTCの毒性については、ラットにおける単回経口投与時のLD₅₀が12918 mg/kgであることが報告されており、また、BPTCをマウスに13週間混餌投与した亜慢性毒性試験の結果では、肝臓重量の増加および肝細胞の腫大、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値およびMCVの減少がみられ、BPTCの主な毒性標的器官は、肝臓および骨髄であると推察されている¹⁾。さらに、マウスにおける癌原性試験では陰性の報告がある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、BPTCの安全性確認の資料を得るために、ラットにおける28日間反復経口投与毒性試験および14日間回復試験を実施した。

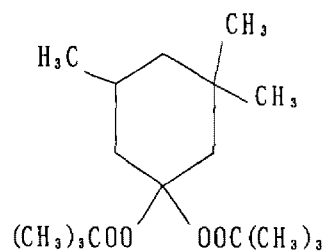
なお、本試験は、「化審法毒性試験法、スクリーニング毒性試験—ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験—」（昭和61年12月5日、環保業第700号、薬発第1039号、61基局第1014号）および「化学物質GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改訂、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として、1,1-ビス[*tert*-ブチルパーオキシ]-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン（以下 BPTC と略記）を用いた。被験物質は、別名をパーヘキサ 3 M と称し、英名は 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethyl cyclohexane であり、CAS No. 6731-36-8、分子量 302.46、分子式 $C_{17}H_{34}O_4$ 、融点（凝固点） -40°C 以下、蒸気圧 $4.3\text{ mmHg}/83^{\circ}\text{C}$ の無色透明の液体である。BPTC の構造式を以下に示す。

構造式



本試験には、より提供された BPTC（ロット番号： 純度： 97.9 wt%）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おいて、冷蔵保管した。

2. 使用動物および飼育方法

生後 4 週で購入した雌雄の Sprague-Dawley 系ラット [Crj:CD(SD) IGS、SPF、日本チャールス・リバー株式会社、筑波飼育センター]（注 1）を検疫と馴化を兼ねて 9 日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各 30 匹を試験に供した（注 2）。動物は、全飼育期間を通じて、基準温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、基準湿度 50~65%、換気回数約 15 回/時、照明 12 時間（7~19 時点灯）に設定された飼育室内で、金属製金網床

（注 1）

動物購入日：1999 年 1 月 13 日

入荷匹数：雄 34 匹 雌 34 匹

入荷時体重：雄 75.6~88.2g（平均 83.2g） 雌 71.9~81.4g（平均 77.3g）

（注 2）

投与開始日：1999 年 1 月 22 日

投与開始時体重：雄 168.8~195.7g（平均 182.7g） 雌 138.9~164.0g（平均 152.3g）

ケージ（220w×270d×190h mm）に1匹ずつ収容し、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由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、空調機の定期的管理作業のために約1時間45分にわたり湿度が基準値を下回った以外いずれも基準値内にあった（注3）。また、供給した飼料および水には、試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

各動物の耳介には、耳パンチを用いて一連の動物番号を標識し、また、群ごとに色の異なる動物カードに試験計画番号、性別、群（投与量）、動物番号を記入して飼育ケージに掛け、個体識別の補助とした。

3. 投与検体の調製

用量ごと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）を加えて溶解して投与検体を調製した。

秦野研究所にて、初回に調製した各濃度の投与検体の含量測定を実施した結果、溶液中の被験物質の平均含量は、所定濃度の96.9～101%であった（Appendix A）。また、動物試験に先立って、安定性試験を実施した結果、被験物質の2および20 w/v%溶液は、調製後、冷蔵、遮光条件下で12日間は安定であることが確認された（Appendix B）ため、投与検体は1週に1回の割合で調製し、使用時まで冷蔵、遮光条件下で保管した。なお、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 C）。

4. 群および群分け

本試験の投与量は、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：C-98-016、投与量：0、500 および 1000 mg/kg）の結果に基づき決定した。すなわち、BPTC を Sprague-Dawley 系ラットに7日間反復投与したところ、雌雄とも 500 mg/kg 以上の投与群で、投与直後に一過性の流涎がみられ、1000 mg/kg 投与群の雌では、投与初期に体重の軽度な増加抑制が認められたが、その他には被験物質投与に起因したと考えられる明らかな変化は認められなかった。以上のことから、1000 mg/kg は、28日間の反復投

（注3）

動物飼育期間中の温湿度の実測値 温度23.5～24.5℃ 湿度35.5～64%

与に耐えうる用量であると判断し、本試験の用量は、雌雄とも高用量を 1000 mg/kg とし、以下公比約 3 で除して 300 および 100 mg/kg を中用量および低用量とした。また、雌雄とも媒体であるコーン油を投与する対照群を設けた。

雌雄とも回復試験を行う対照群および 1000 mg/kg 投与群は各10匹、その他の群は各 5 匹とした。

群分けは、検疫終了時の測定体重をもとに体重別層化無作為抽出法により行った。各群の投与量および動物番号等を以下に示した。

群	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
			雄	雌
対 照 群	0	5	1～10	31～40
低用量群	100	5	11～15	41～45
中用量群	300	5	16～20	46～50
高用量群	1000	5	21～30	51～60

雌雄とも対照群および 1000 mg/kg 投与群では、動物番号の若い方から 5 匹を回復試験に用いた。

5. 投与方法

投与経路は、化審法ガイドラインに従い経口とした。投与時刻は 9 時から15時の間とし、1 日 1 回、28日間、ラット用胃管を用いて投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、各投与時の最近時の体重をもとに個体別に算出した。

なお、投与期間中の日数および週の表記法は、投与開始日および投与開始週をそれぞれ投与第 1 日および投与第 1 週とし、回復試験期間中の日数および週の表記法もこれに準じて回復第 1 日および回復第 1 週とした。

6. 検査項目

1) 一般検査

全例について、毎日（投与期間中は投与前および投与後）一般状態の観察を行った。また、全例の体重および摂餌量を以下の頻度で測定した。体重は、投与第 1 週には投与第 1 日の投与直前と投与第 4 日、投与第 2 週以降の投与期間および回復試験期間中は 1 週に 2 回の頻度で測定した。その他、投与期間終了日、回復試験期間終了日および剖検日、ならびに死亡時にも測定した。摂餌量は、投与第 1 週では、投与第 1 日から 2 日にかけて 1 日

あたりの摂餌量を測定し、以後回復試験期間終了週まで毎週1回の頻度で測定した。

2) 尿検査

各群とも生存している全例について、投与第4週および回復試験期間終了週に、動物を代謝ケージに収容し、4時間尿あるいは新鮮尿で次の項目について検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
色調・混濁度 pH・潜血・蛋白・糖・ケトン体 ウロビリノーゲン・ビリルビン	視 診 試験紙法 同上	— クリテック 200+ (バイエル・三共) 同上

3) 血液学検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時に解剖を行った動物（以下、定期解剖例と記す）は、全例採血前（屠殺剖検前）に18～24時間絶食させた。その後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈から抗凝固剤として EDTA-2K を用いて採血し、以下の項目について検査した。なお、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定に用いる血液については、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として用いて採取した。また、定期解剖例全例の大腿骨骨髓塗抹標本を作製し、投与期間終了時屠殺例の対照群および高用量群について骨髓像検査を実施した。検査の結果、骨髓機能に変化を生じていないと判断し、その他の群では検査を実施しなかった。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
赤血球数 (RBC)	自動 (電気抵抗法)	Coulter Counter Model S-PLUS IV (コルター・エレクトロニクス)
白血球数 (WBC)	同上 (同上)	同上
血色素量 (Hb)	同上 (吸光度法)	同上
平均赤血球容積 (MCV)	同上 (電気抵抗法)	同上
血小板数	同上 (同上)	同上
ハマトクリット値 (Ht)	計算 ($RBC \times MCV \times 0.001$)	
平均赤血球血色素量 (MCH)	同上 ($Hb \times 1000 / RBC$)	
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	同上 ($Hb \times 100 / Ht$)	
白血球分類	視算 (静脈血塗抹標本 Wright-Giemsa染色)	光学顕微鏡
骨髓像検査	同上 (骨髓塗抹標本 Wright-Giemsa染色)	同上
網状赤血球比率	Brecher 法	同上
プロトロンビン時間 (PT)	光散乱検出法	CA-1000 (東亜医用電子)
活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	同上	同上

4) 生化学検査

前述の採血に引き続き、同様の麻酔および採血部位の条件下で、死亡例を除く全例からヘパリンを抗凝固剤として用いて採取した血液について、以下の項目を検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
総蛋白濃度	ビレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
アルブミン濃度	BCG法	同上
総コレステロール濃度	COD・DAOS法	同上
ブドウ糖濃度	グルコキナーゼ G6PDH法	同上
尿素窒素濃度 (BUN)	ウレアゼ G O. DH法	同上
クレアチニン濃度	Jaffe法 (Rate)	同上
ALP活性	GSCC法	同上
GOT活性	IFCC法	同上
GPT活性	同上	同上
γ-GTP活性	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法	同上
トリグリセライド濃度	GPO・DAOS法	同上
無機リン濃度 (Inorg. phos.)	モリブデン酸直接法	同上
カルシウム濃度	OCPC法	同上
A/G比	計算	
ナトリウム濃度	イオン電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)
カリウム濃度	同上	同上
塩素濃度	同上	同上

5) 病理学検査

採血後、死亡例を除く全例の腋窩動脈を切断して放血屠殺した後、器官および組織を肉眼的に観察し、各動物の以下に示す器官の重量を測定した。また、各器官重量を剖検日の体重で除してそれぞれの相対重量を算出した。

重 量 測 定 器 官
脳、心臓、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣

肉眼的観察に引き続き、以下の器官あるいは組織を摘出して保存した。なお、精巣および精巣上体はブアン液で固定し（長期保存は 0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液を使用した）、その他の器官・組織は 0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。さらに、投与期間終了時の全群の*印を付した器官・組織をパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。その後、光学顕微鏡を用いて、対照群および高用量群の組織学検査を実施した。また、対照群および高用量群の雄の全例の腎

臓については、PAS 染色標本を作製した。その他、全例の肉眼的異常が認められた器官・組織の標本を作製し、組織学検査を行った。

その結果、投与期間終了時の対照群と高用量群の組織学検査において、雌雄の肝臓、雄の腎臓および雌の副腎に被験物質投与との関連が疑われる変化が認められたため、その他の群でも組織学検査を実施した。死亡例の器官重量は測定せず、投与期間終了時解剖例と同様の肉眼的観察および組織学検査を行った。

固 定 ・ 保 存 器 官 ・ 組 織

脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓*、気管、気管支、肺、肝臓*、腎臓*、胸腺、脾臓*、副腎*、胃*、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣*、精巣上体*、前立腺、精嚢、卵巣*、子宮、膣、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、骨格筋（下腿部）、坐骨神経、大腿骨骨髓、脾臓、顎下腺、舌下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚、病変部

7. データ解析法

体重、摂餌量ならびに定期解剖例の血液学検査、生化学検査および器官重量は、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群の構成が対照群を含めて3群以上あった場合は、Bartlettの方法により分散の一意性について検定（有意水準：5%）を行った。分散が一意である場合には一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性（有意水準：5%）が認められた場合は、Dunnett法により多重比較を行った。また、分散が一意でない場合は、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意性（有意水準：5%）が認められた場合には、Dunnett型の検定法で多重比較を行った。但し、いずれかの群で分散が0となった場合には、Bartlett法による検定は行わずにKruskal-Wallisの順位検定を行い、その結果、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett型の検定法により多重比較を行った。一方、試験群が対照群を含め2群となった場合には、対照群と被験物質投与群の平均値の差の検定は、各群の平均値および標準偏差値を求めた後、F-検定（有意水準：5%）を行い、等分散の場合にはStudentのt検定法、不等分散の場合にはAspin-Welchのt検定法を用いて有意差検定を行った。但し、どちらかの群で分散が0となった場合には、t検定は実施しなかった。さらに、病理組織所見中グレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定（両側検定）法により、また、陽性グレードの合計値はFisherの直接確率片側検定法により、対照群と被験物質投与群との間の有意差検定を行った（有意水準：5%）。

【結 果】

1. 死亡例

投与期間中に死亡例はみられなかったが、回復第3日に 1000 mg/kg 投与群の雄1例が死亡した。

2. 一般状態 (Table 1、Appendix 1)

投与第2日以降、投与直後の一過性の流涎が、100 mg/kg 投与群の雌1例、300 mg/kg 投与群の雄1例、雌3例、1000 mg/kg 投与群の雄7例、雌9例に認められた。この流涎は、個体によっては投与時の保定の段階でもみられることがあったが、いずれも投与後概ね1時間以内に消失した。回復第3日に死亡した 1000 mg/kg 投与群の雄1例では、死亡前日から後肢が麻痺し、歩行不能状態となり、鼻周囲の褐色の汚れ、血尿と考えられる赤色尿の排泄、立毛が観察された。これらの他には、投与期間および回復試験期間を通して一般状態に変化は認められなかった。

3. 体重 (Fig. 1、Table 2、Appendix 2)

観察期間中、被験物質投与群では、雌雄いずれにおいても対照群との間に体重の有意な差は認められなかった。なお、1000 mg/kg 投与群の雄1例（動物番号：21）では、回復第11日に体重が一過性に減少したが、一般状態には変化はみられず、その原因は不明であった。

4. 摂餌量 (Fig. 2、Table 3、Appendix 3)

1000 mg/kg 投与群の雄では投与第1週に、また、雌では投与第1週および2週に、摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示したが、その後は、いずれの被験物質投与群においても対照群と比較して摂餌量の有意な差は認められなかった。

5. 尿検査所見 (Table 4、Appendix 4)

投与第26日および回復第12日の尿検査では、いずれの検査項目においても、対照群と被験物質投与群の間に著しい差は認められなかった。

6. 血液学検査所見 (Table 5, 6, Appendix 5, 6)

1) 投与期間終了時

1000 mg/kg 投与群では、雄にプロトロンビン時間および活性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。また、雌においても活性部分トロンボプラスチン時間の有意な延長がみられたほか、プロトロンビン時間も延長傾向にあった。さらに、雌では血色素量の有意な減少がみられたほか、白血球分類の好塩基球比率に有意な増加が認められた。骨髓像検査では、1000 mg/kg 投与群の雌の組織球比率が増加し、形質細胞比率が減少した。一方、雌雄とも顆粒球系および赤芽球系いずれの比率にも有意な差はないことから、骨髓機能に変化している可能性はないと判断し、その他の群では検査を実施しなかった。

2) 回復試験期間終了時

被験物質投与群では、雌の血色素量に有意な減少が認められたほか、ヘマトクリット値の有意な減少が雌雄に、また、平均赤血球血色素濃度の有意な上昇が雄に認められた。一方、投与期間終了時にみられた血液凝固時間の延長は、雌雄とも認められなかった。

7. 生化学検査所見 (Table 7, Appendix 7)

1) 投与期間終了時

1000 mg/kg 投与群では、ブドウ糖濃度の有意な低下が雄に、GPT 活性の有意な上昇が雌雄に、 γ -GTP 活性の有意な上昇が雌にそれぞれ認められた。また、雌では、総蛋白濃度の有意な上昇が 1000 mg/kg 投与群に、アルブミン濃度の有意な低下が 100 mg/kg 投与群にそれぞれ認められ、被験物質投与群では、いずれも A/G 比が有意な低値を示した。さらに、300 mg/kg 以上の投与群では、雌に総コレステロール濃度の有意な上昇がみられ、雄にトリグリセライド濃度および GOT 活性の有意な低下が認められた。その他、300 mg/kg 投与群の雄では、ナトリウム濃度の有意な上昇と ALP 活性の有意な低下が認められた。

2) 回復試験期間終了時

被験物質投与群では、雄の A/G 比が有意な低値を示し、雌でもその値は対照群と比較して低い傾向にあった。その他、被験物質投与群の雌では、無機リン濃度に有意な上昇が認められた。

8. 病理学検査所見

1) 器官重量 (Table 8, 9, Appendix 8, 9)

(1) 投与期間終了時解剖例

被験物質投与群では肝臓および腎臓の重量が用量に依存して増加した。すなわち、肝臓の絶対重量は、1000 mg/kg 投与群の雄および 300 mg/kg 以上の投与群の雌に、また、相対重量は、300 mg/kg 以上の投与群の雄および 100 mg/kg 以上の投与群の雌に有意な増加が認められた。腎臓の絶対重量は、300 mg/kg 以上の投与群の雌に、また、相対重量は、300 mg/kg 以上の投与群の雄および 1000 mg/kg 投与群の雌に有意な増加が認められた。その他、雌の被験物質投与群では、いずれも副腎の絶対重量に有意な増加がみられ、相対重量においても有意な増加あるいは増加傾向が認められた。

(2) 回復試験期間終了時解剖例

被験物質投与群では、雌雄の肝臓および腎臓の相対重量に有意な増加がみられたほか、雄の脾臓および雌の脳の相対重量と、卵巣の絶対および相対重量に有意な増加が認められた。

2) 肉眼所見 (Table 10, Appendix 10)

(1) 投与期間終了時解剖例

1000 mg/kg 投与群の雄 4 例、雌 3 例では肝臓の暗色化がみられたほか、大型化が雄 2 例、雌 1 例に、また、小葉像の明瞭化が雌 1 例に認められた。腎臓では、腎盂の拡張が 300 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。胃では、前胃壁の肥厚が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に、また、漿膜面の赤色部が 1000 mg/kg 投与群の雄 2 例に認められた。その他、直腸中の軟便が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に、また、肺の暗色点が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。

(2) 回復試験期間終了時解剖例

被験物質投与群の雄では、肝臓の淡色点および腎臓の大型化が各 1 例に認められた。

(3) 死亡例

回復第 3 日に死亡した 1000 mg/kg 投与群の雄では、貧血と少量の血性胸水の貯留があり、脳および脊髄の硬膜下、胸腺、膀胱、精巣、精巣上体、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節に出血がみられ、膀胱内には凝血塊が認められた。その他、胸腺、肝臓および腎臓の大型化、腎盂の拡張、前立腺の暗色化が認められた。

3) 組織学検査所見 (Table 11、Appendix 11)

(1) 投与期間終了時解剖例

肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が、雄では 300 mg/kg 以上の投与群、雌では 100 mg/kg 以上の投与群に観察され、用量に依存してその程度が増強した (Photo 1)。さらに、雌では肝臓の門脈周囲性の脂肪化が被験物質投与群で増強した。腎臓では、雄の被験物質投与群の全例に、近位尿細管の好酸性細胞質内封入体 (PAS 染色陰性) が観察され、用量に依存してその程度が増強し、さらに、好酸性小体も被験物質投与群の全例に観察された (Photo 2)。また、300 および 1000 mg/kg 投与群の雄の各 3 例には蛋白円柱が認められた。副腎では、雌の各被験物質投与群とも 5 例中 4 例に、束状帯細胞の細胞質肥大が認められた (Photo 3)。この他、Table 11-1-1 および 11-1-2 に示す所見が観察されたが、いずれも対照群と比較してその程度あるいは頻度に有意差のある変化ではなかった。なお、肉眼的に病変がみられた部位の所見として、胃の漿膜面に赤色部が観察された 1000 mg/kg 投与群の雄 2 例中 1 例では、前胃粘膜下織の出血が認められたが、他には組織学的に異常はなかった。

(2) 回復試験期間終了時解剖例

被験物質投与群の雄では、腎臓の好塩基性尿細管が観察される例が多く、その程度も増強し、1 例には蛋白円柱が認められた。なお、投与期間終了時に被験物質投与群の雌雄にみられた肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大、雄にみられた腎臓の近位尿細管の好酸性細胞質内封入体および雌にみられた副腎の束状帯細胞の細胞質肥大は、回復試験期間終了時の検査ではいずれも消失あるいは軽減する傾向にあった。

(3) 死亡例

回復第 3 日に死亡した 1000 mg/kg 投与群の雄では、腎臓の近位尿細管の好酸性細胞質内封入体と好酸性小体、好塩基性尿細管、蛋白円柱、鉍質沈着、腎盂拡張、リンパ球浸潤が認められた。また、肝臓では門脈周囲性の脂肪化、小葉中心性の肝細胞肥大、脾臓では髓外造血、褐色色素沈着、副腎では束状帯細胞質の脂肪顆粒の増加が観察された。さらに、脊髄硬膜下、胸腺、膀胱、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節の出血のほか、精巣、精巣上体、前立腺の間質に出血がみられ、膀胱には好中球の浸潤が認められた。

【考 察】

BPTC をコーン油に溶解して、100、300 および 1000 mg/kg の用量で雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに28日間にわたって強制経口投与し、その後14日間の回復試験期間を設けた。

その結果、一般状態の変化として、雄では 300 mg/kg 以上の投与群に、また、雌では 100 mg/kg 以上の投与群に投与直後の流涎が認められた。流涎は、個体によっては投与時の保定の段階でみられることがあり、いずれも投与後1時間以内に消失する一過性のものではあった。その発症例数は用量に依存し、多くは投与第5日以降にみられ、回復試験期間中にはみられなかったことから、被験物質による味覚刺激等によって成立した条件反射によるものと考えられる。その他、回復第3日に死亡した1例では、死亡前日から後肢が麻痺し、歩行不能状態となり、血尿と考えられる赤色尿の排泄が観察されたが、後肢の麻痺は、後述する脳および脊髄の硬膜下の出血に起因し、血尿は、膀胱の出血によるものと考えられた。

体重および摂餌量の変化として、1000 mg/kg 投与群の雌雄で投与第1週ないし2週の摂餌量が、対照群と比較して低かったが、その後の体重および摂餌量には対照群との間で差は認められず、摂餌量の減少は投与初期のみに認められた変化であった。また、尿検査所見には、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。したがって、被験物質投与により、体重、摂餌量、尿性状には著しい影響を及ぼさないと考えられる。

血液学検査所見として、1000 mg/kg 投与群の雌雄にプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。これらの所見に関連して、回復試験期間中に死亡した 1000 mg/kg 投与群の雄1例では、脳および脊髄の硬膜下、胸腺、膀胱など複数の器官に出血がみられた。一方、回復試験期間終了時の検査では、血液凝固時間の延長はみられなかったことから、これらの所見は可逆的変化と考えられる。その成因については、後述するように、1000 mg/kg 投与群では肝障害が疑われるため、肝臓での血液凝固因子の生成が障害されたことにより、血液凝固時間の延長がみられた可能性が考えられ、さらに、回復試験期間中に死亡した1例でみられた出血も、同様な障害によって生じた所見の可能性も考えられるが、肝障害の程度はいずれも比較的軽度であることから、その詳細は不明である。また、1000 mg/kg 投与群の雌では、投与期間終了時の検査で、血色素量の減少が認められた。回復試験期間終了時の検査では、雌の血色素量に減少

がみられたほか、ヘマトクリット値の減少が雌雄に、平均赤血球血色素濃度の上昇が雄に認められた。マウスに BPTC を投与すると、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値および平均赤血球容積の減少がみられ、造血系への影響が示唆されている¹⁾。しかしながら、本試験の投与期間終了時の骨髓像検査および脾臓の組織学検査では変化が認められなかったことから、本試験の結果からはその機序を明らかにすることはできなかった。なお、1000 mg/kg 投与群の雌では、投与期間終了時の白血球分類において、好塩基球比率の有意な増加がみられ、また、骨髓像の検査において、組織球比率の有意な増加および形質細胞比率の有意な減少が認められたが、いずれの変化も程度はごく軽微なものであったことから、毒性学的意義は乏しいものと考えられる。

生化学検査所見として、1000 mg/kg 投与群では、GPT 活性の上昇が雌雄に、また、 γ -GTP 活性の上昇が雌に、それぞれ認められた。これらは、後述する肝臓の組織所見と関連して、軽度の肝障害がある可能性が示唆された。また、1000 mg/kg 投与群の雌に総蛋白濃度の上昇が、また、100 mg/kg 投与群の雌にアルブミン濃度の低下が、それぞれ有意な差として認められ、雌の被験物質投与群では、いずれも A/G 比が有意な低値を示し、グロブリン濃度の上昇が疑われた。さらに、1000 mg/kg 投与群の雄にブドウ糖濃度の低下が認められた。この他、300 mg/kg 以上の投与群では、雌に総コレステロール濃度の上昇がみられ、雄にトリグリセライド濃度の低下が認められた。一方、回復試験期間終了時の検査では、A/G 比が被験物質投与群の雄で有意な低値を示し、雌でも対照群と比較して低い傾向にあったが、投与期間終了時にみられたこれら以外の変化は認められなかった。これらの変化の成因には、肝臓における蛋白合成、脂質代謝あるいは糖代謝の変化が関与している可能性が考えられる。なお、投与期間終了時の検査でみられた 300 mg/kg 以上の投与群の雄における GOT 活性の変化は上昇ではなく、低下であること、また、300 mg/kg 投与群の雄におけるナトリウム濃度の上昇および ALP 活性の低下は、軽微で、用量に依存した変化ではないことから、いずれも毒性学的意義は乏しいものと考えられる。さらに、回復試験期間終了時に被験物質投与群の雌にみられた無機リン濃度の上昇は、その値が投与期間終了時の対照群の値と同程度であることから、被験物質投与およびその後続く回復試験期間に関連のない変化と考えられる。

病理学検査所見として、被験物質投与群では、雌雄とも用量に依存して肝臓の重量が増加し、組織学的には、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が、雄では 300 mg/kg 以上、雌では 100 mg/kg 以上の投与群に観察され、用量に依存してその程度が増強した。

同様の变化はマウスでも認められ、薬物代謝酵素の誘導が示唆されている^{1, 2)}。今回の試験では、これらの変化に加えて、肝臓の門脈周囲性の脂肪化が雌の被験物質投与群では用量に依存して増強し、前述のように、1000 mg/kg 投与群では GPT 活性あるいは γ -GTP 活性の上昇が認められたことから、軽度ではあるが肝障害作用も示唆された。なお、これらの所見は、投与期間終了後、14日間の回復試験期間を経ることにより、消失あるいは軽減する傾向にあった。腎臓では、被験物質投与群で重量が増加し、雄の全例に近位尿細管の好酸性細胞質内封入体および好酸性小体が観察され、好酸性細胞質内封入体の程度は用量に依存して増強した。これらの変化に関しては、*tert*-butylcyclohexane をはじめ、多くの化学物質投与で、雄ラットにおいて同様の好酸性細胞質内封入体が出現する α 2u-globulin nephropathy が認められている^{3, 4)} ことから、本試験においても同様な変化が生じたものと考えられる。一方、回復試験期間終了時の検査では、これらの変化は消失、あるいは対照群との差がなくなり、尿細管の再生像とみられる好塩基性尿細管が雄の被験物質投与群で増え、その程度も増強した。したがって、雄ラットでは BPTC 投与により腎臓に毒性変化が現れるが、投与中止により、これらの所見は回復傾向を示すことが示唆された。また、雌の被験物質投与群でも腎臓重量の増加がみられたが、組織学検査では著しい変化は認められず、重量増加の成因は、本試験では明らかにすることはできなかった。副腎では、雌の被験物質投与群に重量増加がみられ、組織学的には束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。これらの変化は、回復試験期間終了時には軽減したことから、被験物質投与に起因した変化と考えられるが、その毒性学的意義は不明であった。なお、回復試験期間終了時の検査で認められた被験物質投与群の雌における脳の相対重量、卵巣の絶対および相対重量の有意な増加と雄における脾臓の相対重量の有意な増加はいずれも投与期間終了時には変化がなく、その程度も軽度であったことから、被験物質投与およびその後続く回復試験期間に関連する変化である可能性は低いと考えられる。

以上のように、BPTC の反復投与により、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が雌では 100 mg/kg 以上、雄では 300 mg/kg 以上の用量でみられ、雌ではさらに 100 mg/kg 以上の用量で門脈周囲性の脂肪化の程度が増強したほか、A/G 比の低下が認められた。この他、肝臓に関連する所見として、1000 mg/kg の用量では、雌雄で血液凝固時間の延長、GPT 活性の上昇等が認められ、肝障害作用が示唆された。また、肝臓の他に、雄では 100 mg/kg 以上の用量で腎臓の近位尿細管に好酸性細胞質内封入体が出現し、腎毒性が示

唆され、さらに、雌では 100 mg/kg 以上の用量で副腎の束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。これらのことから、本試験条件下における BPTC の無影響量は雌雄とも 100 mg/kg 未満であると考えられる。

【文 献】

- 1) : 1,1-Bis(*t*-butylperoxy)3,3,5-trimethyl cyclohexane のマウスにおける13週間亜慢性毒性試験, 衛生試験所報告, 110: 42-48 (1992)
- 2) Mitsui, M., Furukawa, F., Sato, M., Enami, T., Imazawa, T., Nishikawa, A. Takahashi, M. : Carcinogenicity study of 1,1-bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in B6C3F₁ mice. *Fd Chem. Toxic.* 31: 929-933 (1993)
- 3) Henningsen, G. M., Yu, K. O., Salomon, R. A., Ferry, M. J., Lopez, I., Roberts, J., Servé, M.P.: The metabolism of *t*-butylcyclohexane in Fischer-344 male rats with hyaline droplet nephropathy. *Toxicology Letter*, 39: 313-318 (1987)
- 4) Lehman-Mckeeman, L. D. : α 2u-Globulin Nephropathy. In : Comprehensive toxicology Volume 7 Renal Toxicology. Sipes, I. G., McQueen, C. A., Gandolfi, A. J., eds, Elsevier science Ltd., Oxford, (1997) pp.667-692

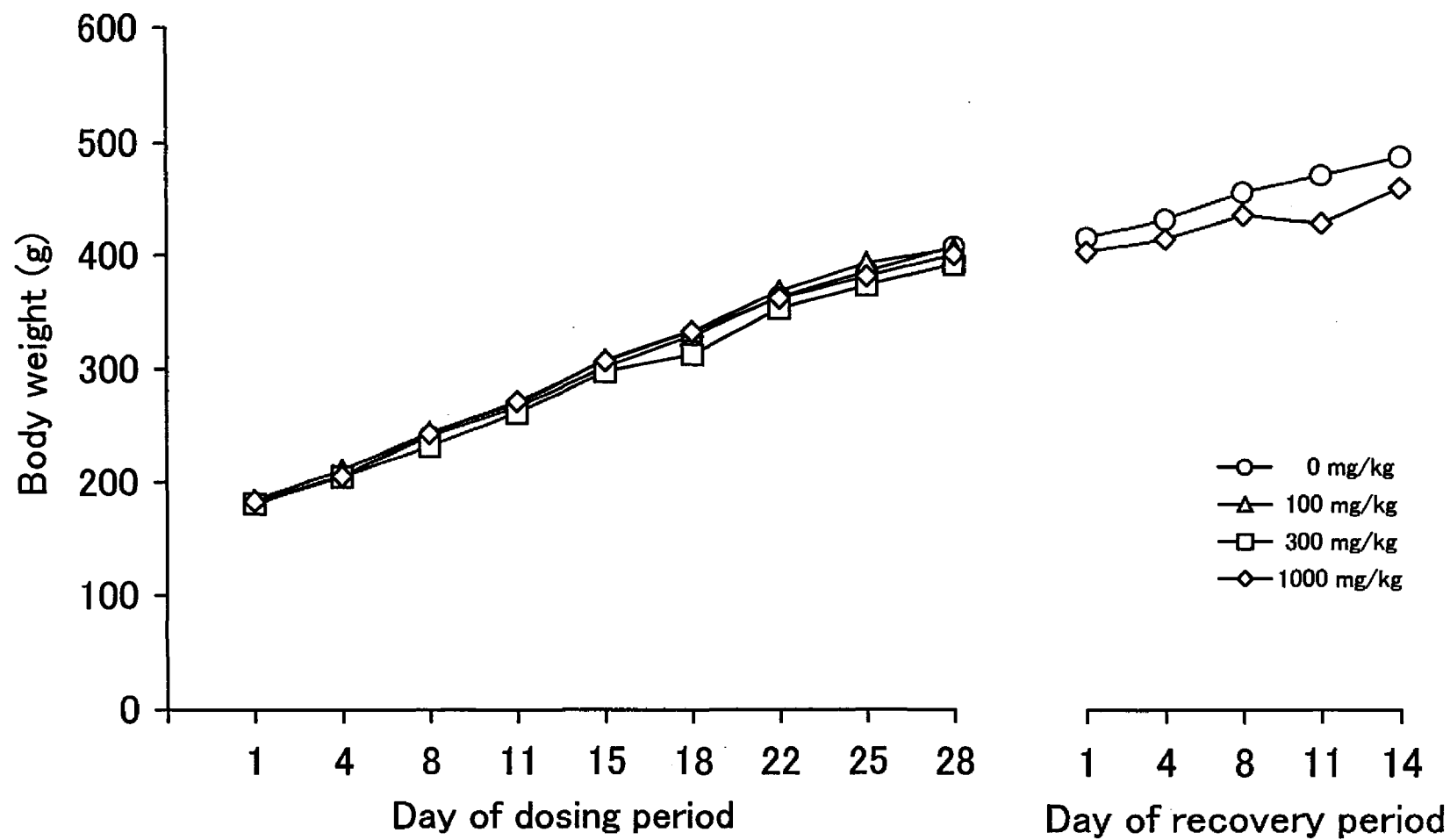


Fig. 1-1.

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Body weight changes in males

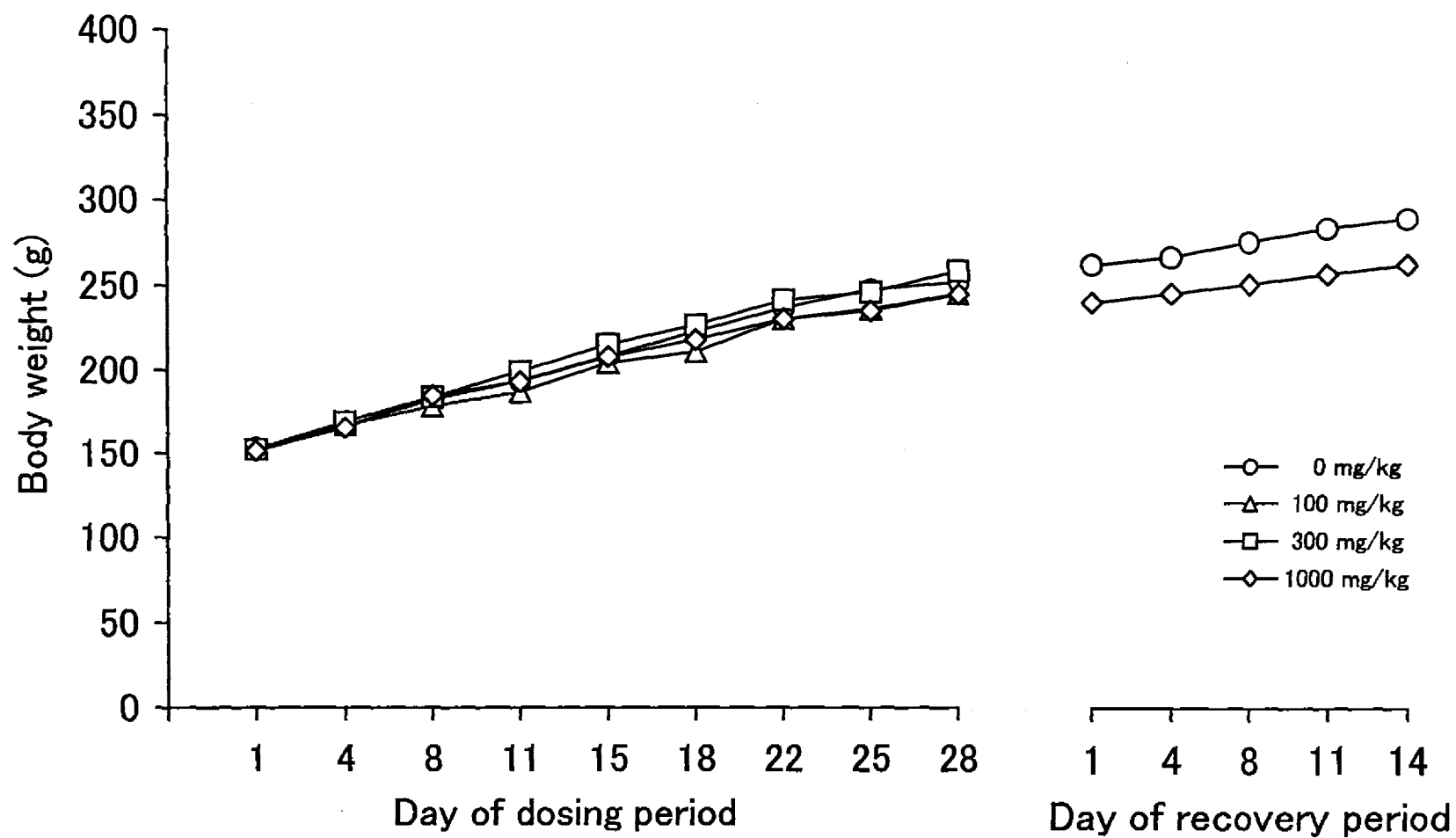


Fig. 1-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Body weight changes in females

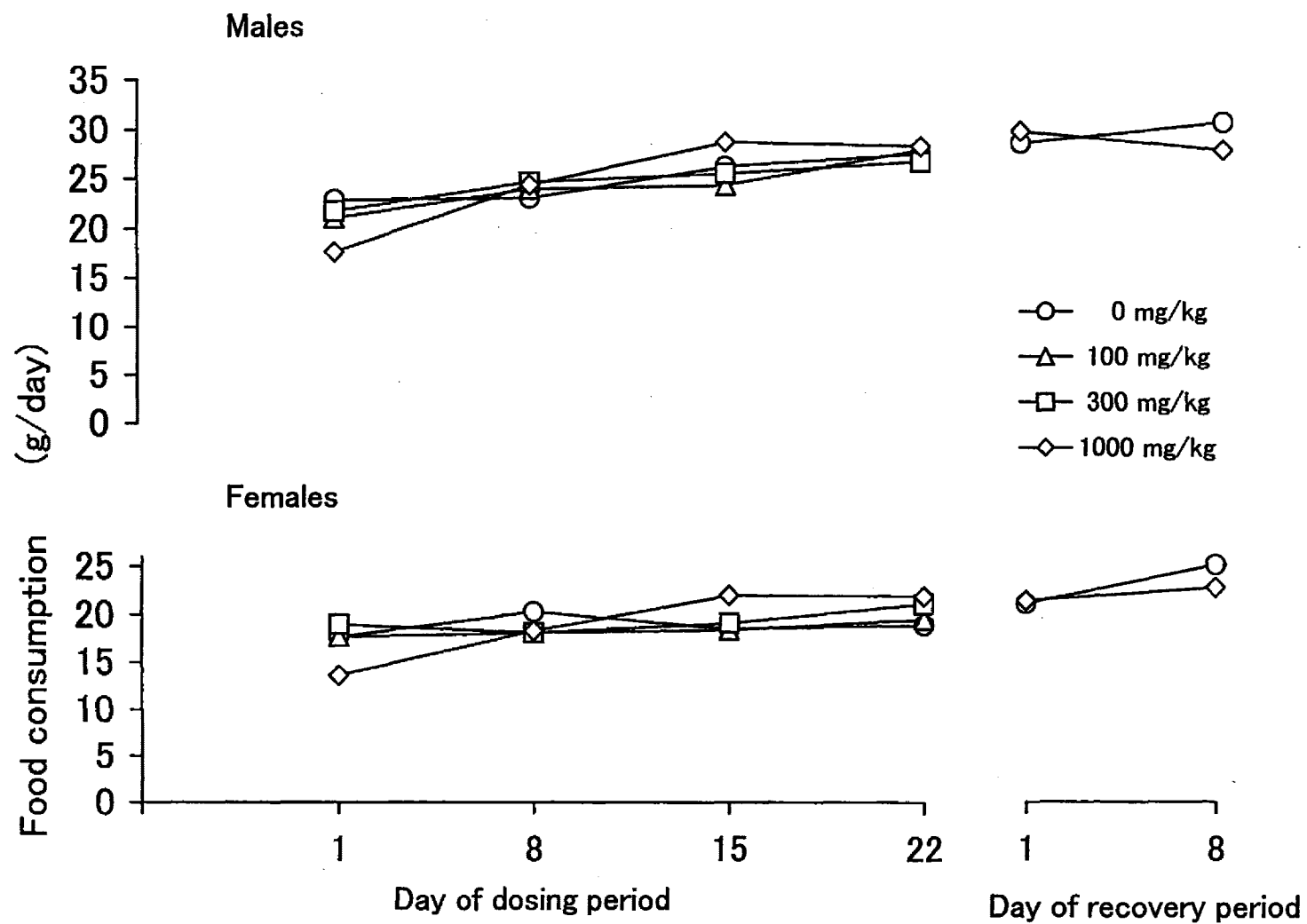


Fig. 2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Food consumption in males and females

Table 1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Clinical signs in males

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs																												Day of - recovery period ^{a)} -					Total
													Day of dosing period																							
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	1	2	3	4~14		
Salivation occurred just after administration (disappeared within about one hour)	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	300	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1			
	1000	10	-	1	-	-	-	2	4	1	5	5	3	3	4	2	4	3	1	2	5	4	4	4	6	2	2	1	2	3	-	-	-	7		
Other signs (Abnormal gait/Deposit of brownish substance around nose/ Red urine/Piloerection)	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	300	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	1000	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1			
Cumulative number of death	0	10																																		
	100	5																																		
	300	5																																		
	1000	10																																		

Clinical signs in females

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs																												Day of - recovery period ^{1a)} -					Total
			Day of dosing period																																	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	1	2	3	4~14		
Salivation occurred just after administration (disappeared within about one hour)	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	100	5	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	1	-	-	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1				1			
	300	5	-	-	-	-	-	1	2	2	3	1	3	3	2	3	2	2	2	3	3	3	2	3	3	2	3	2	3	3				3		
	1000	10	-	-	-	-	4	5	6	5	6	9	6	6	6	5	5	5	5	5	6	5	5	5	5	5	5	5	6	5				9		

a). recovery test was performed in 5 animals of the 0-mg/kg and 1000-mg/kg group of both sexes.

-, no animal showed the sign.

Table 2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Body weight changes in males

Dose (mg/kg)	Day of dosing period									Day of recovery period				
	1	4	8	11	15	18	22	25	28	1	4	8	11	14
0	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	181.9 ±7.9	206.1 ±9.5	241.0 ±12.7	266.8 ±15.9	301.7 ±17.1	329.0 ±19.7	363.5 ±24.9	385.8 ±24.7	407.6 ±26.4	416.0 ±33.3	432.1 ±34.6	456.4 ±37.2	471.6 ±40.9	488.2 ±43.2
100	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)					
	184.7 ±6.7	211.0 ±6.2	244.2 ±12.6	269.6 ±17.9	307.6 ±24.2	333.6 ±29.7	368.5 ±37.7	393.3 ±44.5	405.6 ±51.8					
300	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)					
	181.0 ±6.1	205.3 ±9.2	232.0 ±22.2	261.6 ±17.7	297.4 ±21.3	312.7 ±44.2	353.4 ±25.6	373.6 ±26.6	392.1 ±24.9					
1000	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(4)	(4)	(4)	(4)
	183.4 ±7.0	205.7 ±9.4	242.9 ±14.2	271.8 ±14.0	306.8 ±17.2	333.0 ±18.5	362.6 ±23.6	381.4 ±24.0	400.7 ±25.1	403.3 ±34.0	414.5 ±41.2	436.2 ±38.6	428.6 ±64.0	460.3 ±43.8

Parameter, mean(g)±S.D.
(), number of animals

Table 2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Body weight changes in females

Dose (mg/kg)	Day of dosing period									Day of recovery period				
	1	4	8	11	15	18	22	25	28	1	4	8	11	14
0	(10) 153.1 ±8.0	(10) 166.3 ±9.7	(10) 182.6 ±13.0	(10) 193.3 ±15.0	(10) 208.3 ±16.3	(10) 222.6 ±17.7	(10) 236.6 ±17.2	(10) 247.6 ±19.3	(10) 252.2 ±22.1	(5) 262.5 ±24.7	(5) 267.0 ±26.4	(5) 275.8 ±25.8	(5) 283.8 ±21.8	(5) 289.4 ±24.2
100	(5) 152.6 ±4.1	(5) 166.9 ±6.1	(5) 178.5 ±11.5	(5) 186.7 ±12.5	(5) 204.1 ±8.7	(5) 210.8 ±19.6	(5) 230.2 ±14.4	(5) 236.0 ±14.3	(5) 245.4 ±10.8					
300	(5) 152.3 ±4.7	(5) 169.0 ±7.0	(5) 184.0 ±13.3	(5) 199.0 ±12.3	(5) 215.0 ±14.4	(5) 226.6 ±15.3	(5) 241.4 ±14.2	(5) 246.2 ±20.3	(5) 258.6 ±16.2					
1000	(10) 151.5 ±7.1	(10) 165.4 ±7.4	(10) 184.7 ±10.7	(10) 192.9 ±13.1	(10) 207.8 ±16.9	(10) 217.8 ±13.4	(10) 230.1 ±16.0	(10) 235.0 ±16.8	(10) 244.8 ±18.8	(5) 240.2 ±16.5	(5) 245.5 ±14.2	(5) 251.2 ±13.8	(5) 257.2 ±14.3	(5) 262.7 ±14.1

Parameter. mean(g)±S.D.
(), number of animals

Table 3-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats
Food consumption in males

Dose (mg/kg)	Day of dosing period				Day of recovery period	
	1	8	15	22	1	8
0	(10) 22.9 ±1.8	(10) 23.1 ±2.6	(10) 26.3 ±2.1	(10) 27.6 ±1.7	(5) 29.1 ±0.7	(5) 31.2 ±2.8
100	(5) 21.1 ±1.6	(5) 24.0 ±3.3	(5) 24.4 ±4.4	(5) 28.0 ±6.5		
300	(5) 21.8 ±1.0	(5) 24.7 ±1.6	(5) 25.6 ±2.5	(5) 26.8 ±2.6		
1000	(10) 17.7** ±2.3	(10) 24.4 ±2.0	(10) 28.8 ±2.4	(10) 28.4 ±2.6	(5) 30.3 ±9.5	(4) 28.4 ±6.1

Parameter, mean(σ)±S.D.
(), number of animals

**, significantly different from control. p<0.01

Table 3-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Food consumption in females

Dose (mg/kg)	Day of dosing period				Day of recovery period	
	1	8	15	22	1	8
0	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	17.7	20.3	18.5	18.9	21.5	25.6
	±1.9	±2.2	±3.4	±3.2	±3.6	±3.4
100	(5)	(5)	(5)	(5)		
	17.7	18.1	18.4	19.5		
	±1.3	±2.1	±3.4	±2.6		
300	(5)	(5)	(5)	(5)		
	19.0	18.1	19.1	21.1		
	±1.4	±1.1	±1.4	±4.2		
1000	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	13.6**	18.3*	22.0	21.9	21.8	23.2
	±2.3	±1.2	±5.9	±5.0	±2.5	±2.7

Parameter, mean(g)±S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, p<0.05
**, significantly different from control, p<0.01

Table 4-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Urinalysis in males and females on day 26 of dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color ^{a)}		Turbidity ^{b)}	pH							Protein ^{c)}				Glucose ^{d)}				Ketone ^{b)}				Bilirubin ^{b)}	Occult blood ^{b)}	Urobilinogen ^{e)}
			ly	y	—	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	—	±	+	++	—	—	±	+	—	—	±	+	—	—	±	
Male	0	10	9	1	10	0	0	4	2	1	3	0	2	8	0	10	4	6	0	10			10		10		
	100	5	5	0	5	1	0	1	0	2	1	0	1	3	1	5	2	2	1	5			5		5		
	300	5	5	0	5	1	0	1	2	0	1	0	0	4	1	5	1	1	3	5			5		5		
	1000	10	10	0	10	0	2	3	3	2	0	0	1	7	2	10	4	4	2	10			10		10		
Female	0	10	9	1	10	0	0	3	2	2	3	9	1	0	0	10	10	0	0	10			10		10		
	100	5	5	0	5	1	0	2	0	2	0	4	0	1	0	5	4	1	0	5			5		5		
	300	5	5	0	5	0	2	1	0	1	1	2	0	3	0	5	3	2	0	5			5		5		
	1000	10	9	1	10	0	4	1	2	1	2	7	1	2	0	10	8	2	0	10			10		10		

a) ly, light yellow; y, yellow

b) —, negative; ±, trace; +, slight

c) —, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL

d) —, negative

e) ±, 0.1 E.U./dL

Table 4-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Urinalysis in males and females on day 12 of recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color ^{a)}		Turbidity ^{b)}		pH						Protein ^{c)}				Glucose ^{d)}				Ketone ^{b)}				Bilirubin ^{b)}	Occult blood ^{b)}		Urobilinogen ^{e)}	
			ly	y	—	+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	—	±	+	++	—	—	±	+	—	—	—	—	±	+			
Male	0	5	5	0	4	1	0	0	1	1	1	2	0	1	3	1	5	1	3	1	5	5	5	0	5	0			
	1000	4	4	0	4	0	0	0	1	1	0	2	0	1	3	0	4	1	3	0	4	4	4	0	4	0			
Female	0	5	4	1	5	0	1	0	0	2	2	0	4	0	1	0	5	4	1	0	5	5	4	1	5	0			
	1000	5	5	0	5	0	0	1	3	1	0	0	4	1	0	0	5	5	0	0	5	5	5	0	5	0			

a) ly, light yellow; y, yellow

b) -, negative; ±, trace; +, slight

c) -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL

d) -, negative

e) ±, 0.1 E.U./dL; +, 1.0 E.U./dL

Table 5-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Hematological findings in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 706 ± 35	(5) 14.4 ± 0.5	(5) 41.8 ± 1.2	(5) 59.3 ± 1.2	(5) 20.4 ± 0.6	(5) 34.5 ± 0.6	(5) 3.0 ± 0.5	(5) 103.1 ± 7.0	(5) 14.0 ± 1.4	(5) 20.2 ± 2.3
100	(5) 683 ± 27	(5) 14.3 ± 0.4	(5) 41.0 ± 1.5	(5) 60.1 ± 2.1	(5) 20.9 ± 0.8	(5) 34.8 ± 0.4	(5) 2.6 ± 0.6	(5) 98.2 ± 8.1	(5) 14.7 ± 1.6	(4) 20.7 ± 1.6
300	(5) 680 ± 39	(5) 14.3 ± 0.7	(5) 40.7 ± 2.2	(5) 59.9 ± 1.7	(5) 21.1 ± 0.7	(5) 35.3 ± 0.9	(5) 2.7 ± 0.5	(5) 108.4 ± 6.9	(5) 16.0 ± 1.8	(5) 23.1 ± 2.2
1000	(5) 673 ± 37	(5) 14.3 ± 0.6	(5) 41.0 ± 1.6	(5) 61.1 ± 2.7	(5) 21.3 ± 0.7	(5) 34.7 ± 0.4	(5) 2.5 ± 0.3	(5) 111.0 ± 4.8	(5) 38.9** ± 17.9	(5) 45.4** ± 17.0

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 83 ± 21	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 2	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 1 ± 1	(5) 90 ± 3
100	(5) 80 ± 11	(5) 0 ± 0	(5) 7 ± 2	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 1	(5) 91 ± 2
300	(5) 79 ± 15	(5) 0 ± 0	(5) 10 ± 3	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 1 ± 0	(5) 89 ± 2
1000	(5) 88 ± 29	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 4	(5) 0 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 1 ± 1	(5) 90 ± 4

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(), number of animals**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 5-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Hematological findings in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 701 ± 15	(5) 14.7 ± 0.3	(5) 42.4 ± 1.3	(5) 60.4 ± 2.5	(5) 21.0 ± 0.6	(5) 34.8 ± 0.9	(5) 1.6 ± 0.6	(5) 97.5 ± 6.4	(5) 11.6 ± 0.3	(5) 17.8 ± 1.2
100	(5) 662 ± 65	(5) 14.3 ± 0.7	(5) 40.7 ± 2.9	(5) 61.6 ± 1.7	(5) 21.7 ± 1.1	(5) 35.3 ± 0.9	(5) 2.8 ± 1.4	(5) 94.2 ± 12.8	(5) 11.5 ± 0.4	(5) 18.4 ± 1.7
300	(5) 664 ± 24	(5) 14.0 ± 0.4	(5) 39.3 ± 1.0	(5) 59.2 ± 2.1	(5) 21.1 ± 0.9	(5) 35.6 ± 0.3	(5) 1.9 ± 0.4	(5) 108.8 ± 11.6	(5) 11.1 ± 0.3	(5) 18.7 ± 1.4
1000	(5) 678 ± 20	(5) 13.8* ± 0.4	(5) 39.8 ± 1.8	(5) 58.8 ± 2.3	(5) 20.4 ± 0.7	(5) 34.7 ± 0.7	(5) 1.9 ± 0.3	(5) 106.4 ± 10.8	(5) 15.5 ± 2.4	(5) 25.8** ± 3.4

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 45 ± 15	(5) 0 ± 0	(5) 10 ± 6	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 2	(5) 87 ± 7
100	(5) 49 ± 12	(5) 0 ± 0	(5) 11 ± 5	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 3	(5) 85 ± 7
300	(5) 42 ± 14	(5) 0 ± 0	(5) 7 ± 3	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 2	(5) 89 ± 3
1000	(5) 48 ± 10	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 5	(5) 1 ± 1	(5) 1* ± 1	(5) 2 ± 1	(5) 89 ± 5

Parameter. mean $\pm$ S.D.
(). number of animals

*, significantly different from control. $p < 0.05$
**, significantly different from control. $p < 0.01$

Table 5-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Hematological findings in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 795 ± 32	(5) 15.4 ± 0.4	(5) 46.2 ± 1.3	(5) 58.2 ± 3.1	(5) 19.5 ± 0.8	(5) 33.4 ± 0.4	(5) 2.4 ± 0.9	(5) 92.5 ± 7.4	(5) 14.8 ± 2.3	(5) 18.4 ± 0.9
1000	(4) 757 ± 40	(4) 15.0 ± 0.4	(4) 43.1** ± 1.3	(4) 57.0 ± 3.3	(4) 19.8 ± 0.9	(4) 34.8** ± 0.5	(4) 2.5 ± 0.8	(4) 91.8 ± 9.6	(4) 12.4 ± 0.5	(4) 18.9 ± 0.9

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 87 ± 12	(5) 0 ± 0	(5) 9 ± 4	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 1 ± 2	(5) 89 ± 5
1000	(4) 93 ± 21	(4) 0 ± 0	(4) 12 ± 9	(4) 0 ± 1	(4) 0 ± 0	(4) 2 ± 2	(4) 87 ± 8

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(), number of animals**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 5-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Hematological findings in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (Pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 768 ± 50	(5) 15.4 ± 0.5	(5) 44.3 ± 1.6	(5) 57.8 ± 2.2	(5) 20.1 ± 1.0	(5) 34.7 ± 0.7	(5) 2.3 ± 0.8	(5) 94.4 ± 4.1	(5) 11.1 ± 0.3	(5) 16.0 ± 0.5
1000	(5) 715 ± 34	(5) 14.2* ± 0.7	(5) 40.6* ± 2.0	(5) 56.8 ± 1.3	(5) 19.9 ± 0.3	(5) 35.1 ± 0.8	(5) 2.2 ± 0.3	(5) 96.8 ± 6.0	(5) 11.0 ± 0.4	(5) 16.7 ± 0.8

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 54 ± 17	(5) 0 ± 0	(5) 7 ± 4	(5) 0 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 93 ± 4
1000	(5) 47 ± 7	(5) 0 ± 0	(5) 6 ± 5	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 1	(5) 91 ± 5

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 6-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Myelogram in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Myeloblast	Promyelocyte	Neutrophilic myelocyte	Neutrophilic metamyelocyte	Neutrophil	Eosinophilic myelocyte	Eosinophilic metamyelocyte	Eosinophil	Basophil, all types	Total granulocyte
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	(5) 2.2 ±0.3	(5) 2.0 ±0.5	(5) 3.5 ±0.6	(5) 10.8 ±2.5	(5) 19.2 ±3.7	(5) 1.0 ±0.4	(5) 1.8 ±0.8	(5) 0.5 ±0.4	(5) 0.4 ±0.3	(5) 41.3 ±4.6
1000	(5) 1.9 ±0.9	(5) 2.6 ±1.3	(5) 3.2 ±1.2	(5) 13.1 ±2.3	(5) 22.1 ±3.5	(5) 1.0 ±0.6	(5) 1.8 ±0.9	(5) 0.8 ±0.6	(5) 0.5 ±0.3	(5) 47.0 ±7.2

Dose (mg/kg)	Pro- erythroblast	Basophilic erythroblast	Polychromatic erythroblast	Normoblast	Total erythrocyte	Histiocyte	Lymphocyte	Plasma cell	Mega- karyocyte	Mast cell	Myeloid / Erythroid
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	(5) 0.2 ±0.2	(5) 4.5 ±1.3	(5) 16.5 ±3.9	(5) 9.1 ±1.7	(5) 30.2 ±5.7	(5) 3.0 ±0.9	(5) 25.0 ±4.3	(5) 0.2 ±0.2	(5) 0.2 ±0.3	(5) 0.1 ±0.1	(5) 1.4 ±0.4
1000	(5) 0.1 ±0.3	(5) 3.0 ±1.1	(5) 13.9 ±2.7	(5) 10.1 ±1.7	(5) 27.0 ±2.4	(5) 3.0 ±1.6	(5) 22.4 ±4.6	(5) 0.3 ±0.3	(5) 0.2 ±0.2	(5) 0.1 ±0.2	(5) 1.8 ±0.4

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals

Table 6-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Myelogram in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Myeloblast (%)	Promyelocyte (%)	Neutrophilic myelocyte (%)	Neutrophilic metamyelocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophilic myelocyte (%)	Eosinophilic metamyelocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil. all types (%)	Total granulocyte (%)
0	(5) 2.4 ±1.2	(5) 1.4 ±0.2	(5) 3.8 ±1.0	(5) 13.8 ±3.8	(5) 21.0 ±3.6	(5) 0.9 ±0.5	(5) 2.4 ±1.0	(5) 1.2 ±0.5	(5) 0.4 ±0.2	(5) 47.3 ±8.3
1000	(5) 1.9 ±0.7	(5) 1.4 ±0.7	(5) 3.4 ±1.0	(5) 10.6 ±2.3	(5) 20.6 ±4.9	(5) 1.4 ±0.7	(5) 2.4 ±0.9	(5) 1.0 ±0.7	(5) 0.9 ±0.8	(5) 43.6 ±8.6

Dose (mg/kg)	Pro- erythroblast (%)	Basophilic erythroblast (%)	Polychromatic erythroblast (%)	Normoblast (%)	Total erythrocyte (%)	Histiocyte (%)	Lymphocyte (%)	Plasma cell (%)	Mega- karyocyte (%)	Mast cell (%)	Myeloid / Erythroid (%)
0	(5) 0.2 ±0.3	(5) 4.1 ±0.6	(5) 10.5 ±2.0	(5) 9.2 ±0.9	(5) 24.0 ±3.1	(5) 1.9 ±0.6	(5) 26.3 ±6.2	(5) 0.2 ±0.2	(5) 0.1 ±0.1	(5) 0.1 ±0.1	(5) 2.0 ±0.6
1000	(5) 0.0 ±0.0	(5) 3.6 ±2.0	(5) 11.2 ±3.6	(5) 10.0 ±3.4	(5) 24.9 ±8.9	(5) 3.6** ±0.8	(5) 27.7 ±4.1	(5) 0.0* ±0.1	(5) 0.1 ±0.2	(5) 0.1 ±0.1	(5) 2.0 ±0.9

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals

*, significantly different from control, p<0.05
**, significantly different from control, p<0.01

Table 7-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Biochemical findings in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Total Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)
0	(5) 5.2 ±0.3	(5) 3.0 ±0.1	(5) 1.39 ±0.26	(5) 141 ±13	(5) 45 ±9	(5) 60 ±10	(5) 12 ±2	(5) 0.5 ±0.1	(5) 6.8 ±0.3	(5) 8.6 ±0.2
100	(5) 5.2 ±0.3	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.45 ±0.15	(5) 129 ±18	(5) 44 ±8	(5) 51 ±22	(5) 12 ±2	(5) 0.5 ±0.0	(5) 7.0 ±0.4	(5) 8.9 ±0.3
300	(5) 5.2 ±0.2	(5) 3.0 ±0.1	(5) 1.37 ±0.10	(5) 121 ±19	(5) 43 ±9	(5) 31** ±7	(5) 13 ±3	(5) 0.5 ±0.0	(5) 6.5 ±0.2	(5) 8.8 ±0.2
1000	(5) 5.4 ±0.4	(5) 3.0 ±0.2	(5) 1.24 ±0.13	(5) 106* ±19	(5) 49 ±4	(5) 34* ±10	(5) 16 ±3	(5) 0.6 ±0.1	(5) 6.6 ±0.4	(5) 8.9 ±0.4

Dose (mg/kg)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 145.2 ±0.6	(5) 3.96 ±0.23	(5) 106.0 ±0.7	(5) 423 ±45	(5) 25 ±3	(5) 60 ±4	(5) 0 ±0
100	(5) 145.5 ±0.9	(5) 3.95 ±0.44	(5) 105.9 ±1.6	(5) 342 ±47	(5) 24 ±2	(5) 54 ±4	(5) 0 ±0
300	(5) 146.8* ±1.3	(5) 3.80 ±0.13	(5) 106.0 ±1.2	(5) 286** ±72	(5) 26 ±1	(5) 52** ±5	(5) 0 ±1
1000	(5) 146.6 ±1.0	(5) 3.88 ±0.34	(5) 106.3 ±0.9	(5) 333 ±61	(5) 32** ±2	(5) 52* ±2	(5) 1 ±1

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, p<0.05
**, significantly different from control, p<0.01

Table 7-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Biochemical findings in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Inorg. Phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)
0	(5) 5.2 ±0.2	(5) 3.5 ±0.1	(5) 2.02 ±0.12	(5) 116 ±3	(5) 54 ±8	(5) 25 ±4	(5) 13 ±3	(5) 0.6 ±0.1	(5) 6.4 ±0.4	(5) 8.5 ±0.2
100	(5) 5.0 ±0.2	(5) 3.1* ±0.3	(5) 1.60** ±0.23	(5) 112 ±4	(5) 57 ±7	(5) 25 ±4	(5) 11 ±1	(5) 0.6 ±0.1	(5) 6.1 ±0.3	(5) 8.4 ±0.4
300	(5) 5.4 ±0.2	(5) 3.2 ±0.2	(5) 1.46** ±0.13	(5) 113 ±9	(5) 69* ±6	(5) 28 ±6	(5) 12 ±1	(5) 0.6 ±0.0	(5) 5.7 ±0.4	(5) 8.5 ±0.3
1000	(5) 5.7** ±0.3	(5) 3.3 ±0.2	(5) 1.39** ±0.14	(5) 112 ±8	(5) 74** ±8	(5) 20 ±2	(5) 13 ±1	(5) 0.6 ±0.0	(5) 5.9 ±0.6	(5) 8.4 ±0.2

Dose (mg/kg)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 144.9 ±0.8	(5) 3.41 ±0.12	(5) 110.2 ±1.0	(5) 204 ±62	(5) 18 ±3	(5) 49 ±3	(5) 0 ±0
100	(5) 145.7 ±0.5	(5) 3.40 ±0.18	(5) 110.4 ±1.7	(5) 197 ±21	(5) 20 ±3	(5) 53 ±4	(5) 0 ±1
300	(5) 145.6 ±1.0	(5) 3.36 ±0.24	(5) 109.0 ±0.9	(5) 215 ±48	(5) 21 ±3	(5) 48 ±5	(5) 1 ±0
1000	(5) 145.8 ±1.7	(5) 3.45 ±0.24	(5) 108.6 ±1.9	(5) 228 ±22	(5) 26** ±4	(5) 50 ±3	(5) 3** ±1

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, p<0.05
**, significantly different from control, p<0.01

Table 7-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Biochemical findings in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Inorg. Phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)
0	(5) 5.5 ±0.4	(5) 3.0 ±0.2	(5) 1.24 ±0.07	(5) 143 ±19	(5) 44 ±8	(5) 61 ±22	(5) 17 ±2	(5) 0.6 ±0.0	(5) 7.2 ±0.6	(5) 8.7 ±0.3
1000	(4) 5.7 ±0.4	(4) 2.9 ±0.3	(4) 1.02** ±0.09	(4) 142 ±10	(4) 59 ±15	(4) 48 ±8	(4) 18 ±2	(4) 0.6 ±0.1	(4) 7.2 ±0.4	(4) 9.0 ±0.3

Dose (mg/kg)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 144.5 ±1.0	(5) 3.78 ±0.16	(5) 106.6 ±1.1	(5) 318 ±67	(5) 28 ±4	(5) 61 ±6	(5) 0 ±0
1000	(4) 143.8 ±0.6	(4) 3.88 ±0.16	(4) 105.8 ±1.4	(4) 259 ±20	(4) 60 ±73	(4) 93 ±75	(4) 1 ±1

Parameter, mean±S.D.
(). number of animals

**, significantly different from control, p<0.01

Table 7-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Biochemical findings in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Total Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)
0	(5) 5.7 ±0.3	(5) 3.4 ±0.2	(5) 1.45 ±0.11	(5) 156 ±12	(5) 71 ±9	(5) 38 ±7	(5) 18 ±2	(5) 0.6 ±0.0	(5) 5.7 ±0.4	(5) 8.9 ±0.2
1000	(5) 6.0 ±0.3	(5) 3.3 ±0.3	(5) 1.26 ±0.18	(5) 145 ±10	(5) 72 ±10	(5) 35 ±8	(5) 21 ±4	(5) 0.6 ±0.1	(5) 6.3* ±0.4	(5) 8.9 ±0.2

Dose (mg/kg)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 144.0 ±0.5	(5) 3.70 ±0.38	(5) 108.8 ±0.8	(5) 206 ±32	(5) 22 ±3	(5) 53 ±6	(5) 0 ±0
1000	(5) 144.3 ±0.8	(5) 3.44 ±0.21	(5) 108.0 ±0.9	(5) 149 ±57	(5) 22 ±6	(5) 55 ±7	(5) 1 ±1

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals

*, significantly different from control, p<0.05

Table 8-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Absolute organ weights in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)	Epididymides (mg)
0	(5) 375.8 ±25.3	(5) 1886.7 ±79.9	(5) 656.7 ±126.9	(5) 1211.3 ±132.4	(5) 12210.8 ±1086.5	(5) 2724.1 ±275.4	(5) 823.8 ±71.9	(5) 52.5 ±6.5	(5) 3117.6 ±213.2	(5) 740.6 ±48.1
100	(5) 380.9 ±43.7	(5) 1938.9 ±48.4	(5) 730.7 ±179.9	(5) 1182.1 ±129.9	(5) 13089.8 ±2126.3	(5) 2800.1 ±227.2	(5) 839.4 ±142.1	(5) 50.7 ±6.0	(5) 3215.9 ±271.5	(5) 769.3 ±23.9
300	(5) 362.1 ±27.3	(5) 1947.4 ±60.2	(5) 699.4 ±204.1	(5) 1232.0 ±147.0	(5) 14086.4 ±1269.4	(5) 2960.1 ±235.5	(5) 713.3 ±21.9	(5) 54.0 ±3.3	(5) 3295.5 ±236.0	(5) 751.3 ±63.1
1000	(5) 362.7 ±10.3	(5) 1943.8 ±79.8	(5) 617.3 ±208.3	(5) 1122.9 ±83.0	(5) 17279.6** ±1331.4	(5) 3104.7 ±304.4	(5) 664.9 ±87.7	(5) 47.8 ±3.5	(5) 3222.4 ±243.7	(5) 738.7 ±49.3

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 8-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Absolute organ weights in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries (mg)
0	(5) 229.5 ±17.8	(5) 1809.0 ±86.4	(5) 460.6 ±77.8	(5) 792.8 ±53.5	(5) 6795.4 ±624.9	(5) 1639.4 ±103.8	(5) 483.2 ±42.7	(5) 55.3 ±5.1	(5) 84.7 ±11.8
100	(5) 227.5 ±9.0	(5) 1794.3 ±106.4	(5) 449.2 ±96.4	(5) 774.5 ±62.4	(5) 7973.9 ±292.9	(5) 1751.6 ±92.4	(5) 563.8 ±27.2	(5) 67.9** ±2.2	(5) 87.9 ±10.8
300	(5) 240.0 ±14.8	(5) 1827.3 ±65.4	(5) 621.8 ±159.6	(5) 788.9 ±69.7	(5) 10724.9* ±412.6	(5) 1904.2** ±60.4	(5) 587.9 ±120.0	(5) 67.6** ±8.8	(5) 89.3 ±14.9
1000	(5) 227.5 ±19.5	(5) 1811.1 ±101.7	(5) 479.3 ±84.7	(5) 770.9 ±79.0	(5) 13379.8** ±1316.2	(5) 1946.0** ±164.1	(5) 472.6 ±47.4	(5) 73.3** ±4.1	(5) 94.1 ±8.6

Parameter. mean±S.D.
(), number of animals

*, significantly different from control, p<0.05
**, significantly different from control, p<0.01

Table 8-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Absolute organ weights in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)	Epididymides (mg)
0	447.3 ±39.6 (5)	1987.5 ±68.9 (5)	522.5 ±51.0 (5)	1327.2 ±96.6 (5)	13337.4 ±1723.3 (5)	2914.7 ±147.8 (5)	842.0 ±183.5 (5)	54.4 ±18.0 (5)	3444.6 ±171.1 (5)	1060.6 ±61.7 (5)
1000	420.3 ±41.6 (4)	1936.6 ±52.1 (4)	446.7 ±63.7 (4)	1294.2 ±127.8 (4)	14888.1 ±2627.8 (4)	3413.0 ±495.4 (4)	1082.0 ±271.5 (4)	61.5 ±1.5 (4)	3252.1 ±242.5 (4)	1017.6 ±57.4 (4)

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals

Table 8-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Absolute organ weights in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries (mg)
0	(5) 265.2 ±25.1	(5) 1826.3 ±86.7	(5) 525.2 ±141.9	(5) 838.4 ±61.0	(5) 7162.0 ±824.4	(5) 1850.4 ±120.3	(5) 577.8 ±96.4	(5) 67.3 ±6.9	(5) 84.0 ±7.4
1000	(5) 240.2 ±13.4	(5) 1864.1 ±79.8	(5) 378.3 ±81.4	(5) 804.6 ±78.1	(5) 8269.3 ±690.5	(5) 1876.2 ±182.7	(5) 522.9 ±81.4	(5) 63.3 ±5.6	(5) 122.0* ±29.1

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 9-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Relative organ weights in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)	Epididymides (mg/g)
0	(5) 375.8 ±25.3	(5) 5.037 ±0.363	(5) 1.750 ±0.341	(5) 3.221 ±0.237	(5) 32.478 ±1.488	(5) 7.239 ±0.379	(5) 2.197 ±0.198	(5) 0.140 ±0.016	(5) 8.316 ±0.657	(5) 1.974 ±0.122
100	(5) 380.9 ±43.7	(5) 5.149 ±0.657	(5) 1.917 ±0.398	(5) 3.106 ±0.080	(5) 34.232 ±1.965	(5) 7.382 ±0.459	(5) 2.207 ±0.346	(5) 0.135 ±0.026	(5) 8.579 ±1.612	(5) 2.045 ±0.280
300	(5) 362.1 ±27.3	(5) 5.400 ±0.403	(5) 1.929 ±0.520	(5) 3.395 ±0.205	(5) 38.929** ±2.394	(5) 8.195* ±0.662	(5) 1.981 ±0.194	(5) 0.150 ±0.018	(5) 9.143 ±0.942	(5) 2.088 ±0.274
1000	(5) 362.7 ±10.3	(5) 5.364 ±0.289	(5) 1.697 ±0.546	(5) 3.099 ±0.253	(5) 47.605** ±2.800	(5) 8.551** ±0.670	(5) 1.832 ±0.221	(5) 0.132 ±0.010	(5) 8.879 ±0.521	(5) 2.039 ±0.162

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals

*, significantly different from control, $p < 0.05$
**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 9-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Relative organ weights in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
0	(5) 229.5 ±17.8	(5) 7.915 ±0.646	(5) 2.010 ±0.338	(5) 3.468 ±0.313	(5) 29.593 ±0.909	(5) 7.178 ±0.715	(5) 2.112 ±0.206	(5) 0.242 ±0.032	(5) 0.369 ±0.049
100	(5) 227.5 ±9.0	(5) 7.885 ±0.314	(5) 1.968 ±0.376	(5) 3.403 ±0.220	(5) 35.064** ±1.196	(5) 7.699 ±0.318	(5) 2.479 ±0.099	(5) 0.299* ±0.015	(5) 0.386 ±0.049
300	(5) 240.0 ±14.8	(5) 7.637 ±0.536	(5) 2.577 ±0.564	(5) 3.284 ±0.108	(5) 44.780** ±2.333	(5) 7.960 ±0.573	(5) 2.435 ±0.375	(5) 0.282 ±0.032	(5) 0.372 ±0.053
1000	(5) 227.5 ±19.5	(5) 8.000 ±0.712	(5) 2.097 ±0.223	(5) 3.394 ±0.283	(5) 58.861** ±3.595	(5) 8.565** ±0.442	(5) 2.091 ±0.279	(5) 0.324** ±0.034	(5) 0.417 ±0.064

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals

*, significantly different from control, $p < 0.05$
**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 9-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Relative organ weights in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)	Epididymides (mg/g)
0	(5) 447.3 ±39.6	(5) 4.468 ±0.391	(5) 1.178 ±0.183	(5) 2.975 ±0.176	(5) 29.735 ±1.861	(5) 6.548 ±0.550	(5) 1.878 ±0.358	(5) 0.121 ±0.033	(5) 7.767 ±1.017	(5) 2.383 ±0.214
1000	(4) 420.3 ±41.6	(4) 4.636 ±0.388	(4) 1.069 ±0.160	(4) 3.083 ±0.165	(4) 35.263* ±3.317	(4) 8.146* ±1.052	(4) 2.559* ±0.465	(4) 0.147 ±0.016	(4) 7.773 ±0.657	(4) 2.429 ±0.108

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 9-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Relative organ weights in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
0	(5) 265.2 ±25.1	(5) 6.927 ±0.648	(5) 1.964 ±0.424	(5) 3.170 ±0.171	(5) 26.973 ±1.008	(5) 6.996 ±0.322	(5) 2.180 ±0.328	(5) 0.254 ±0.014	(5) 0.318 ±0.033
1000	(5) 240.2 ±13.4	(5) 7.774* ±0.415	(5) 1.573 ±0.308	(5) 3.345 ±0.198	(5) 34.398** ±1.466	(5) 7.811* ±0.621	(5) 2.171 ±0.269	(5) 0.263 ±0.021	(5) 0.506* ±0.107

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals

*, significantly different from control, $p < 0.05$
**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 10-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Macroscopical findings in males at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Dark	5	0	5	0	5	0	1	4
Enlargement	5	0	5	0	5	0	3	2
(Kidney)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Dilatation, pelvis	5	0	5	0	4	1	5	0
(Stomach)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Thickened wall, forestomach	5	0	5	0	5	0	4	1
Area, red, on serosa, forestomach	5	0	5	0	5	0	3	2
(Rectum)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Soft, stool	5	0	5	0	5	0	4	1
(Lung)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Spot, dark	5	0	5	0	5	0	4	1

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 10-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Macroscopical findings in females at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Dark	5	0	5	0	5	0	2	3
Enlargement	5	0	5	0	5	0	4	1
Accentuation, lobular pattern	5	0	5	0	5	0	4	1

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 10-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Macroscopical findings in males at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg		1000 mg/kg	
	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[4]	
Spot, pale	5	0	3	1
(Kidney)	[5]		[4]	
Enlargement	5	0	3	1

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 11-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Histological findings in males at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg								
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.			
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]								
Fatty change, periportal	0	2	3	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	2	3	0	0	5	0	1	4	0	0	5			
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	**	5 ##	0	2	2	1	0	**	5 ##	
(Kidney)	[5]						[5]						[5]						[5]								
Inclusion body, intracytoplasmic, eosinophilic, proximal tubule	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	**	5 ##	0	0	3	2	0	**	5 ##	0	0	0	5	0	**	5 ##
Eosinophilic body, proximal tubule	5	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	**	5 ##	0	3	2	0	0	**	5 ##	0	2	3	0	0	**	5 ##
Basophilic tubule	2	1	2	0	0	3	2	1	2	0	0	3	0	3	2	0	0	5	0	3	1	1	0	5			
Cast, proteinous	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3	2	0	3	0	0	3			
Cellular infiltration, lymphocyte	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4	0	5	0	0	0	5	2	3	0	0	0	3			
(Spleen)	[5]																		[5]								
Deposit, pigment, brown	0	4	1	0	0	5													0 5 0 0 0 5								
Hematopoiesis, extramedullary	0	0	5	0	0	5													0 0 5 0 0 5								
Congestion	5	0	0	0	0	0													4 0 1 0 0 1								
(Adrenal gland)	[5]																		[5]								
No abnormalities																											
(Stomach)	[5]																		[5]								
Hemorrhage, submucosa, forestomach	5	0	0	0	0	0													4 1 0 0 0 1								
(Heart)	[5]																		[5]								
No abnormalities																											
(Testis)	[5]																		[5]								
No abnormalities																											
(Epididymis)	[5]																		[5]								
No abnormalities																											
(Rectum)																			[1]								
No abnormalities																											
(Lung)																			[1]								
No abnormalities																											

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

**, significantly different from control, $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test).##, significantly different from control, $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test).

Table 11-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Histological findings in females at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Fatty change, periportal	2	3	0	0	0	3	0	1	2	2	0*	5	0	0	2	3	0**	5	0	0	4	1	0**	5
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0	1	3	1	0	0	4#	0	0	2	3	0**	5##	0	0	0	5	0**	5##
(Adrenal gland)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Hypertrophy, cytoplasm, zona fasciculata	5	0	0	0	0	0	1	3	1	0	0	4#	1	2	2	0	0	4#	1	1	3	0	0	4#
(Kidney)	[5]																		[5]					
Basophilic tubule	2	3	0	0	0	3													2	3	0	0	0	3
Cast, proteinous	4	1	0	0	0	1													4	1	0	0	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte	2	2	1	0	0	3													4	1	0	0	0	1
Mineralization, cortico-medullary junction	4	1	0	0	0	1													3	2	0	0	0	2
(Spleen)	[5]																		[5]					
Deposit, pigment, brown	0	2	3	0	0	5													0	0	5	0	0	5
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	0	0	0	5													0	5	0	0	0	5
Congestion	5	0	0	0	0	0													4	0	1	0	0	1
(Stomach)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Heart)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Ovary)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

**, significantly different from control, $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test).*, significantly different from control, $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test).##, significantly different from control, $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test).#, significantly different from control, $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test).

Table 11-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Histological findings in males at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[4]					
Fatty change, periportal	0	2	2	1	0	5	2	2	0	0	0	2
Granuloma	5	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	2
(Kidney)	[5]						[4]					
Inclusion body, intracytoplasmic, eosinophilic, proximal tubule	4	1	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0
Eosinophilic body, proximal tubule	3	2	0	0	0	2	3	1	0	0	0	1
Basophilic tubule	4	1	0	0	0	1	0	2	0	2	0 *	4 #
Cast, proteinous	5	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	1

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

*, significantly different from control, $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test).#, significantly different from control, $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test).

Table 11-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BPTC in rats

Histological findings in females at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]					
Fatty change, periportal	2	3	0	0	0	3	2	1	2	0	0	3
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2
Granuloma	3	2	0	0	0	2	1	3	0	1	0	4
(Adrenal gland)	[5]						[5]					
Hypertrophy, cytoplasm, zona fasciculata	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.