食薬セ研第１０－１６３１号

２０００年　８月２５日

o-ジクロロベンゼンの
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 …… 7

7．データ解析法 …… 9

結　果 …… 11

1．死亡例 …… 11

2．一般状態 …… 11

3．体重 …… 11

4．摂餌量 …… 11

5．摂水量 …… 12

6．尿検査所見 …… 12

7．血液学検査所見 …… 12

8．生化学検査所見 …… 12

9．病理学検査所見 …… 13

考　察 …… 15

文　献 …… 18

Figures 1～2 …… 19

Tables 1～11 …… 22

【要　　約】

o-ジクロロベンゼンの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 20、100 および 500 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 500 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。

一般状態の変化として、500 mg/kg 投与群では、投与初日に流涎および流涙がみられる例があり、投与第2日から7日まで排便量の減少が認められた。この他、投与第9日以降、雄では 100 mg/kg 以上の投与群、雌では 500 mg/kg 投与群で、投与直後の一過性の流涎がみられ、一部の例では投与後1時間以上継続して観察されることがあり、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った。また、500 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与初期に摂餌量が減少し、体重は、投与第4日以降回復試験期間終了日まで対照群と比較して低値で推移し、雄では回復第4日まで継続して有意な差が認められた。一方、摂水量には、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。

投与第4週の尿検査では、500 mg/kg 投与群のほとんどの例が pH 9 以上を示し、雄では尿蛋白の程度が低い傾向にあったが、他の項目では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。

生化学検査では、500 mg/kg 投与群において、総コレステロール濃度およびγ-GTP 活性の有意な上昇あるいは上昇傾向が雌雄に、尿素窒素、無機リン濃度、GOT 活性の有意な上昇と A/G 比およびナトリウム濃度の有意な低下が雄に、それぞれ認められた。一方、回復試験終了時の検査では、これらの変化は認められなかった。なお、血液学検査では、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有意な差は認められなかった。

器官重量では、100 mg/kg 以上の投与群の雄および 500 mg/kg 投与群の雌の肝臓および腎臓の絶対あるいは相対重量が増加した。この他、500 mg/kg 投与群の雄では、胸腺、心臓、脾臓および精巣上体の絶対重量に有意な減少がみられ、精巣上体重量の有意な減少は 100 mg/kg 投与群でも認められた。一方、回復試験期間終了時の被験物質投与群では、投与期間終了時にみられた器官重量の変化は認められなかった。

投与期間終了時の剖検所見としては、高用量群を中心に肝臓の暗色化と大型化が観察された。組織学検査では、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が、雌雄とも 100 mg/kg 以上の投与群にみられ、その変化の程度は雌雄とも用量に依存して増強する傾向にあった。また、小葉中心性の単細胞壊死が 500 mg/kg 投与群の雌雄および 100 mg/kg 投与群の雄の多くの例に認められた。さらに、通常の飼育形態で対照群に観察される肝臓の門脈周囲性の脂肪化は、500 mg/kg 投与群の雄には認められなかった。腎臓では、雄の 100 mg/kg 以上の投与群において、近位尿細管の好酸性細胞質内封入体の頻度あるいは程度が有意に増加した。回復試験期間終了時には、投与期間終了時にみられたこれらの形態的変化は消失あるいは軽減する傾向にあった。

以上のように、o-ジクロロベンゼンを反復投与することにより、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が雌雄とも 100 mg/kg 以上の用量でみられ、さらに、雄の 100 mg/kg 以上の用量と雌の 500 mg/kg の用量では、小葉中心性の単細胞壊死が認められた。また、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有意な頻度あるいは程度で出現し、この変化は被験物質投与に起因した変化であることが示唆された。これらのことから、本試験条件下における o-ジクロロベンゼンの無影響量は雌雄とも 20 mg/kg であると考えられる。

【緒　　言】

o-ジクロロベンゼンは、ワックスやゴムの溶剤、殺虫剤、燻蒸剤等に使用されている[1)]。*o*-ジクロロベンゼンの毒性については、ラットにおける単回経口投与時の LD_{50} は 500 mg/kg[2)] あるいは 2138 mg/kg[3)] であることが報告されている。また、ラットにおける癌原性試験を含む反復経口投与毒性試験では、主として肝臓および腎臓に障害を及ぼすことが報告されている[4,5)]。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、*o*-ジクロロベンゼン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。

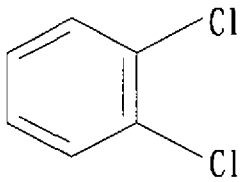
なお、本試験は、「化審法毒性試験法、スクリーニング毒性試験－ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験－」（昭和61年12月５日、環保業第700号、薬発第1039号、61基局第1014号）および「化学物質GLP」（昭和59年３月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方　　法】

1．被験物質

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

構造式



本試験には、三井化学株式会社より提供された DCB（ロット番号：8803302、純度：99.7%）を用いた。受領物質は、使用時まで被験物質受領保管室において、室温で保管した。

2．使用動物および飼育方法

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６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±１℃、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、金属製金網床ケージ

（注１）
動物購入日：1999年３月24日
入荷匹数：雄34匹　　雌34匹
入荷時体重：雄83.4～98.1g（平均90.3g）　雌76.0～88.7g（平均81.5g）
（注２）
投与開始日：1999年３月30日
投与開始時体重：雄144.6～161.8g（平均154.1g）　雌127.1～138.7g（平均132.0g）

(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、いずれも基準値の範囲内にあった（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 97.3～99.9%であった（Appendix A）。また、本試験に先立って、安定性試験を実施した結果、被験物質の 0.2 および 20 w/v% 溶液は、調製後、室温条件下で10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、使用時まで室温条件下で保管した。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、高速液体クロマトグラフ法により測定した（Appendix C）。なお、試験計画書には、調製検体の被験物質濃度の測定に関して、検量線の範囲を 10～50μg/mL と記載したが、実際の操作時にはその範囲を 10～40μg/mL とした試験計画書からの逸脱があった。本件については、検量線の範囲が 10～40μg/mL であっても被験物質の濃度を検量線から読み取るのに支障はなく、投与検体の安定性および含量の測定に影響はないと判断した。

4．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-98-025、投与量：

（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52～61%

0、250、500 および 1000 mg/kg) の結果に基づき決定した。すなわち、DCB を 7 日間反復経口投与することにより、1000 mg/kg 投与群の雌 3 例中 1 例が投与第 4 日に瀕死状態となった。また、1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも明らかな体重の増加抑制があり、一般状態の変化としては、流涙、活動性低下、歩行異常、被毛の汚れ、排便量の減少などのほか、尿の黄色調が強く、尿量が多い傾向にあった。一方、250 および 500 mg/kg 投与群では、投与初日から翌日にかけて体重が減少したが、その後はほぼ順調に増加し、一般状態では、500 mg/kg 投与群で投与初日に流涙がみられた以外には変化は認められず、剖検所見においても被験物質投与に起因すると思われる変化はなかった。以上のことから、本試験の用量は、高用量を 500 mg/kg とし、以下公比 5 で除して 100 および 20 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。

雌雄とも投与期間終了後14日間の回復試験を行う対照群および 500 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	20	5	11～15	41～45
中用量群	100	5	16～20	46～50
高用量群	500	5	21～30	51～60

雌雄とも対照群および 500 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11時から14時の間とし、1 日 1 回、28日間、ラット用胃管を用いて強制投与した。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、摂餌量および摂水量を以下のとおり測定した。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。摂水量は、投与第4週および回復試験期間終了週の尿検査時に、代謝ケージ内で1日あたりの摂水量を測定した。

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、以下の項目について検査した。但し、試験紙による検査および色調・混濁度は4時間尿あるいは新鮮尿で、その他の項目は約24時間の蓄尿で行った。

項　　目	測　定　法	使　用　機　器
色調・混濁度	視　診	
尿量	計　量	天秤
比重	重量法	天秤
pH・潜血・蛋白・糖・ｹﾄﾝ体	試験紙法	ｸﾘﾆﾃｯｸ 200+　(ﾊﾞｲｴﾙ・三共)
ｳﾛﾋﾞﾘﾉｰｹﾞﾝ・ﾋﾞﾘﾙﾋﾞﾝ	同上	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。

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(ｺｰ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
ﾍﾏﾄｸﾘｯﾄ値(Ht)	計算（RBC×MCV×0.001）	
平均赤血球血色素量(MCH)	同上（Hb×1000/RBC）	
平均赤血球血色素濃度(MCHC)	同上（Hb×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
網状赤血球比率	Brecher 法	同上
ﾌﾟﾛﾄﾛﾝﾋﾞﾝ時間(PT)	光散乱検出法	CA-1000(東亜医用電子)
活性部分ﾄﾛﾝﾎﾞﾌﾟﾗｽﾁﾝ時間(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、全例からヘパリンを抗凝固剤とし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	ﾋﾞｳﾚｯﾄ法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA(ﾛｼｭ)
ｱﾙﾌﾞﾐﾝ濃度	BCG法	同上
総ｺﾚｽﾃﾛｰﾙ濃度	COD･DAOS法	同上
ﾌﾞﾄﾞｳ糖濃度	ｸﾞﾙｺｷﾅｰｾﾞ G6PDH法	同上
尿素窒素濃度(BUN)	ｳﾚｱｰｾﾞ GℓDH法	同上
ｸﾚｱﾁﾆﾝ濃度	Jaffé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-ｸﾞﾙﾀﾐﾙ-3-ｶﾙﾎﾞｷｼ-4-ﾆﾄﾛｱﾆﾘﾄﾞ基質法	同上
ﾄﾘｸﾞﾘｾﾗｲﾄﾞ濃度	GPO・DAOS法	同上
無機ﾘﾝ濃度 (Inorg. phos.)	ﾓﾘﾌﾞﾃﾞﾝ酸直接法	同上
総ﾋﾞﾘﾙﾋﾞﾝ濃度	Jendrassik/Grof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、必要に応じて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に固定し（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%ホルマリン溶液に固定した。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、投与期間終了時解剖例の器官重量で、雄の胸腺に有意な減少が認められたため、組織学検査対象器官にこれを加えた。その他、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、雌雄の肝臓および雄の腎臓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、他の群でも組織学検査を実施し、また、高用量群の雄の腎臓については、PAS 染色標本を作製し、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、大腿骨骨髄、膵臓＊、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、摂水量、半定量検査を除く尿検査ならびに定期解剖例の血液学検査、生化学検査の値および器官重量は、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様性について検定（有意水準：5%）を行った。分散が一様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、分散が一様でない場合は、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各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

投与期間および回復試験期間中に死亡例はなかった。

2．一般状態（Table 1、Appendix 1）

500 mg/kg 投与群では、投与第1日の投与後1時間以降に流涎および流涙がみられる例があった。また、排便量の減少が投与第2日から4日に雌雄全例で認められたが、投与第8日以降には消失した。この他、雄1例では投与第3日に一過性の赤色尿が認められた。100 mg/kg 投与群では、投与第2日に一過性の軟便が雌1例にみられたほか、雄1例では投与第8日から10日に排便量の減少が認められた。20 mg/kg 投与群では、投与第10日に一過性の軟便が雄1例に認められた。さらに、投与第9日以降、投与直後の一過性の流涎が、500 mg/kg 投与群の雌雄全例、100 mg/kg 投与群の雄3例にみられ、このうち 500 mg/kg 投与群の雄4例、雌1例、100 mg/kg 投与群の雄1例では、投与後1時間以上継続して観察されることがあった。この流涎は、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った。

3．体重（Fig. 1、Table 2、Appendix 2）

500 mg/kg 投与群の雌雄とも、投与第4日の体重が対照群と比較して有意な低値を示し、その後回復試験期間終了日まで低値で推移し、雄では回復第4日まで継続して有意な差が認められた。一方、100 mg/kg 以下の投与群では、雌雄とも対照群との間に体重の有意な差は認められなかった。

4．摂餌量（Fig. 2、Table 3、Appendix 3）

500 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与第1週の摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示し、雌では投与第4週の摂餌量が有意な高値を示した。一方、100 mg/kg 以下の投与群および回復試験期間中の被験物質投与群では、雌雄とも対照群との間に摂餌量の有意な差は認められなかった。

5．摂水量（Table 4、Appendix 4）

投与第4週および回復第2週に測定した摂水量には、雌雄とも対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。

6．尿検査所見（Table 5、Appendix 5）

投与第4週の尿検査では、100 mg/kg 投与群の雌の尿量に有意な増加がみられたが、用量依存性のある変化ではなかった。また、500 mg/kg 投与群では、雌1例を除く全例が pH 9 以上を示し、雄では尿蛋白の程度が低い傾向にあった。さらに、対照群の雌1例では、尿が混濁し、強い潜血反応陽性を示した。回復第2週の尿検査では、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。

7．血液学検査所見（Table 6、Appendix 6）

投与期間終了時および回復試験期間終了時の血液学検査所見には、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有意な差は認められなかった。

8．生化学検査所見（Table 7、Appendix 7）

1）投与期間終了時

500 mg/kg 投与群では、総コレステロール濃度およびγ-GTP 活性の有意な上昇あるいは上昇傾向が雌雄に、尿素窒素、無機リン濃度、GOT 活性の有意な上昇と A/G 比およびナトリウム濃度の有意な低下が雄に、それぞれ認められた。この他、100 mg/kg 投与群の雄では、ALP 活性の有意な低下がみられ、20 mg/kg 投与群の雌では、総蛋白およびアルブミン濃度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、ブドウ糖濃度の有意な低下が雄に、カルシウム濃度の有意な上昇が雌に認められたが、投与期間終了時に変化のみられた項目には有意な差は認められなかった。

9．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

500 mg/kg 投与群では、肝臓の絶対および相対重量と腎臓の相対重量の有意な増加が雌雄にみられたほか、雄では胸腺、心臓、脾臓および精巣上体の絶対重量に有意な減少が認められた。また、100 mg/kg 投与群の雄では、肝臓および腎臓の相対重量の有意な増加と精巣上体の絶対重量の有意な減少が認められた。

(2)回復試験期間終了時解剖例

被験物質投与群では、雌の脳の絶対重量に有意な減少がみられた以外に、有意な差は認められなかった。

2）肉眼所見（Table 10、Appendix 10）

(1)投与期間終了時解剖例

肝臓では、暗色化が 500 mg/kg 投与群の雄2例、雌1例に、大型化が 500 mg/kg 投与群の雌雄各2例と 100 mg/kg 投与群の雌1例に観察された。腎臓では、大型化および弾力性の低下が 500 mg/kg 投与群の雄に各1例、嚢胞が 100 mg/kg 投与群の雌1例に認められた。脾臓では、淡色化が 500 mg/kg 投与群の雄2例、小型化が 500 mg/kg 投与群の雄に1例、暗色化が 500 mg/kg 投与群の雌1例に観察された。この他、100 mg/kg 投与群の雄1例では、投与過誤による所見と考えられる胸腔内結節が認められた。

(2)回復試験期間終了時解剖例

対照群および被験物質投与群の雌雄とも、肉眼的所見は観察されなかった。

3）組織学検査所見（Table 11、Appendix 11）

(1)投与期間終了時解剖例

肝臓では、小葉中心性の肝細胞肥大（Photo 1）が 500 mg/kg 投与群の雌雄全例、100 mg/kg 投与群の雄全例、雌2例に観察され、その変化の程度は雌雄とも用量に依存して増強する傾向にあった。また、小葉中心性の単細胞壊死が 500 mg/kg 投与群の雌雄および 100 mg/kg 投与群の雄の多くの例に認められた。さらに、通常の飼育形態で対照群に観察される肝臓の門脈周囲性の脂肪化は、500 mg/kg 投与群の雄には認められなかった。

腎臓では、近位尿細管の好酸性細胞質内封入体 (Photo 2) が雄の 500 mg/kg 投与群の全例、100 mg/kg 投与群の 4 例および 20 mg/kg 投与群の 1 例に観察された。なお、高用量群の雄の腎臓について PAS 染色を行った結果、近位尿細管の好酸性細胞質内封入体はいずれも PAS 陰性であった。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、いずれの所見も群間でその発生頻度および程度に差は認められなかった。また、器官重量で有意な減少がみられた高用量群の雄の胸腺には、組織学的変化は認められなかった。さらに、肉眼的に病変がみられた部位の所見として、腎臓の嚢胞がみられた 100 mg/kg 投与群の雌 1 例では、組織学的にも嚢胞が認められ、また、100 mg/kg 投与群の雄 1 例にみられた胸腔内結節は、組織学的に異物肉芽腫であったことから、投与過誤が原因で生じたと考えられる。

(2)回復試験期間終了時解剖例

肝臓では、小葉中心性の単細胞壊死が被験物質投与群の雄 1 例にみられ、門脈周囲性の脂肪化は対照群および被験物質投与群の雌雄全例に観察された。この他、雄の腎臓では、11-2-1 に示す所見がみられたが、いずれも群間でその発生頻度および程度に差は認められなかった。

【考　　察】

DCB を、20、100 および 500 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、主として肝臓および腎臓で被験物質投与に起因したと考えられる変化が生じた。すなわち、雌雄とも 500 mg/kg 投与群では肝臓重量が増加し、100 mg/kg 以上の投与群では小葉中心性の肝細胞肥大がみられ、その変化の程度は雌雄とも用量に依存して増強する傾向にあった。また、小葉中心性の単細胞壊死も観察された。これらと同質の肝臓の組織学変化は、DCB を SD 系ラットあるいは F344 ラットに3か月間反復経口投与した試験[4,5]でも認められており、DCB 投与による標的器官の一つが肝臓であることが確認された。これらの変化に関連すると考えられる生化学所見としては、GOT あるいは γ-GTP 活性の上昇と、総コレステロール濃度の上昇、アルブミン濃度の低下に伴う A/G 比の低下が認められた。さらに、今回の試験では、通常の飼育形態で対照群に観察される肝臓の門脈周囲性の脂肪化が、500 mg/kg 投与群の雄には認められなかった。なお、これらの肝臓に関連した変化は、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。

一方、腎臓では、雄の被験物質投与群に近位尿細管の好酸性細胞質内封入体が観察され、その頻度および程度とも用量に依存して増強し、絶対および相対重量とも増加あるいは増加傾向にあった。DCB の位置異性体である *p*-dichlorobenzene の反復経口投与により、雄ラットの近位尿細管上皮に hyaline droplet が蓄積することから、*p*-dichlorobenzene は、いわゆるα2u-globulin nephropathy を惹起することが明らかにされており[6]、DCB も同様の腎病変を誘発するものと考えられる。なお、20 mg/kg 投与群の1例にみられた近位尿細管の好酸性細胞質内封入体は、雄ラットに自然発症性の変化としてみられる程度の軽微なものであった。また、500 mg/kg 投与群の雄では、血漿中の尿素窒素および無機リン濃度の上昇とナトリウム濃度の低下が認められたが、いずれも軽微な変化であり、前述の組織学所見との関連性については不明であった。さらに、500 mg/kg 投与群の雌では、腎臓の相対重量が増加したが、組織学所見としては著しい変化はなかったことから、雌における腎臓の相対重量の増加は、体重増加抑制が主な原因と考えられる。この他、投与第4週の尿検査では、500 mg/kg 投与群の雌雄とも、ほとんどの例が pH 9 以上を示し、雄では尿蛋白の程度が低い傾向にあったが、これらの変化の成

因については明らかにすることはできなかった。一方、近位尿細管の好酸性細胞質内封入体を含む腎臓に関する所見は、投与中止によりいずれも消失したことから、回復性のある変化と考えられる。なお、すでに報告されている DCB のラットにおける反復経口投与毒性試験[4, 5]では、摂水量あるいは尿量の増加がみられているが、今回の試験では中用量である 100 mg/kg 投与群の雌で尿量の有意な増加がみられた以外に、摂水量および尿量に有意な変化は認められなかった。

その他、500 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与初日に被験物質の刺激性[1]によると考えられる流涎および流涙がみられた。また、投与初期に摂餌量および排便量の減少があり、体重は、対照群と比較して回復試験期間終了日まで低値で推移し、雄では回復第 4 日まで継続して有意な差が認められた。さらに、投与第 9 日以降、雄では 100 mg/kg 以上の投与群、雌では 500 mg/kg 投与群で、投与直後の一過性の流涎がみられ、一部の例では投与後 1 時間以上継続して観察されることがあり、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った。その発症例数は用量に依存し、投与中期から観察され、回復試験期間中にはみられなかったことから、投与直後の流涎は、被験物質の刺激性によって成立した条件反射によるものと考えられる。なお、500 mg/kg 投与群の雌では、投与第 4 週の摂餌量が有意な高値を示したが、変化の程度としてはわずかであり、体重にもこれに関連すると考えられる変化はなかった。

500 mg/kg 投与群の雄では、胸腺および脾臓の絶対重量が減少した。これらの変化も前述した既報の 3 か月間反復投与試験で認められているが、いずれも相対重量には有意な差がみられず、血液学所見および組織学所見にも変化がなかった。この他、器官重量の減少としては、500 mg/kg 投与群の雄の心臓と 100 mg/kg 以上の投与群の精巣上体に有意な差がみられたが、いずれも相対重量には有意な差は認められず、関連すると考えられる組織学所見がなかったことから、これらの変化は投与初期からの体重の増加抑制による影響があったものと考えられる。

なお、以上の変化の他に投与期間終了時あるいは回復試験期間終了時に有意差のみられた生化学所見および器官重量の変化については、いずれも用量に依存した変化ではなく、関連する他の所見もなかったことから、被験物質投与およびその後に続く回復試験期間に関連のない変化と考えられる。

以上のように、DCB を反復投与することにより、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が雌雄とも 100 mg/kg 以上の用量でみられ、さらに、雄の 100 mg/kg 以上の用量と雌の

500 mg/kg の用量では、小葉中心性の単細胞壊死が認められた。また、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有意な頻度あるいは程度で出現し、この変化は被験物質投与に起因した変化であることが示唆された。これらのことから、本試験条件下における DCB の無影響量は雌雄とも 20 mg/kg であると考えられる。

【文　　献】

1) The Merck Index. Twelfth edition. Merck & Co., Inc. (1996) pp. 517

2) Ben-Dyke R., Sanderson D. M., Noakes D. N. : Acute toxicity data for pesticides. World Review of Pest Control. 9 : 119-127 (1970)

3) Varshavskaya, S. P. : Sanitary-toxicologic characteristics of mono- and dichlorobenzene and *o*-dichlorobenzene. Gigienicheskaya Otsenka Khimicheskikh Faktorov Veneshniesredy. Moscow (1966) pp. 35-37.

4) Robinson M., Bercz J. P., Ringhand H. P., Condie L. W., Parnell M. J. : Ten- and ninety-day toxicity studies of 1,2-dichlorobenzene administered by oral gavage to Sprague-Dawley rats. Drug and Chemical Toxicology. 14 : 83-112 (1991)

5) "Toxicology and carcinogenesis studies of 1,2-dichlorobenzene (*o*-dichlorobenzene) (CAS NO. 95-50-1) in F344/N rats and B6C3F$_1$ mice (gavage studies)". NTP TR 255 NIH Publication No. 86-2511. National Toxicology Program. U. S. A. (1985)

6) Bomhard E., Luckhaus G., Voigt W.-H., Loeser E. : Induction of light hydrocarbon nephropathy by *p*-dichlorobenzene. Archives of Toxicology. 61 : 433-439 (1988)

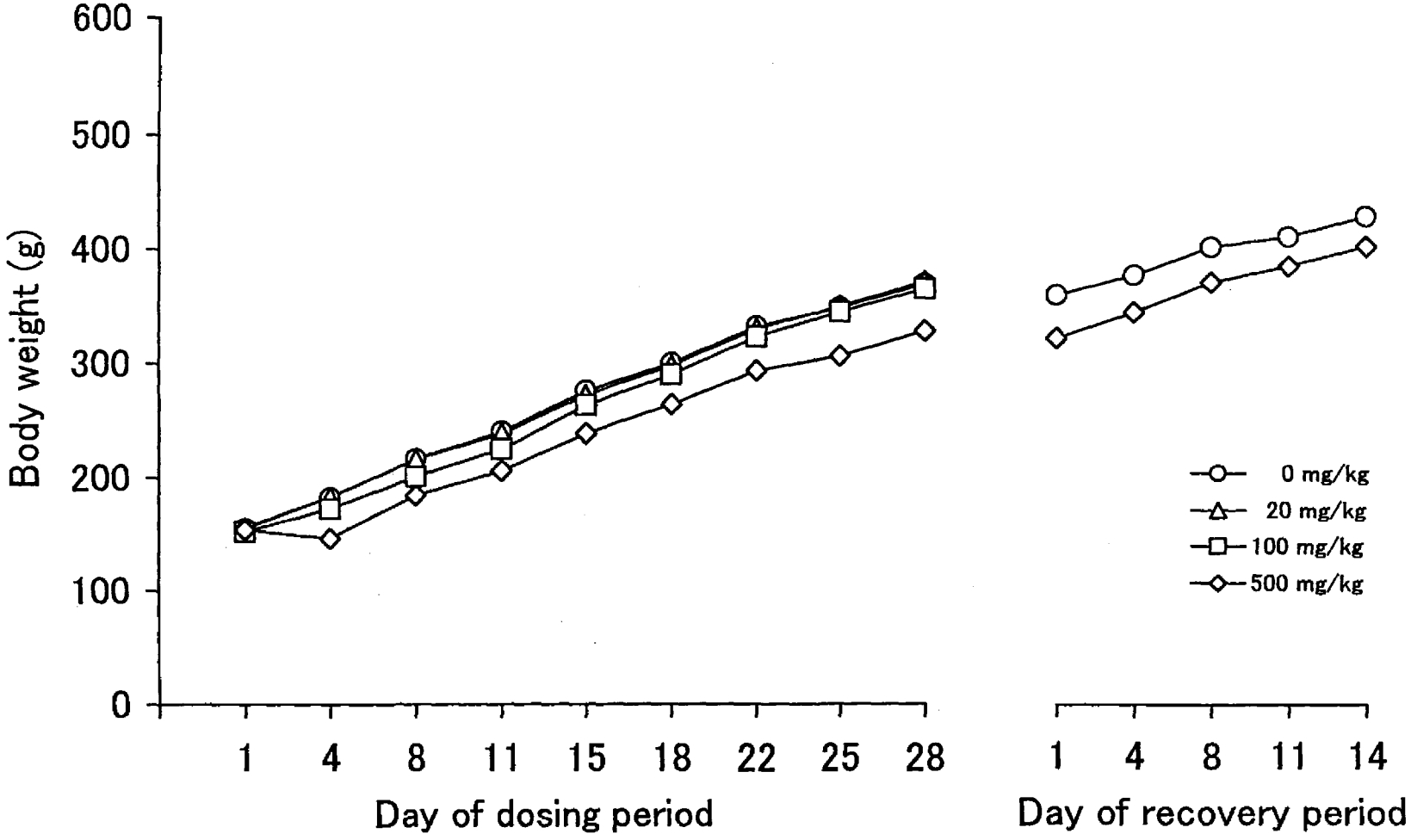


Fig. 1-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB in rats

Body weight changes in males

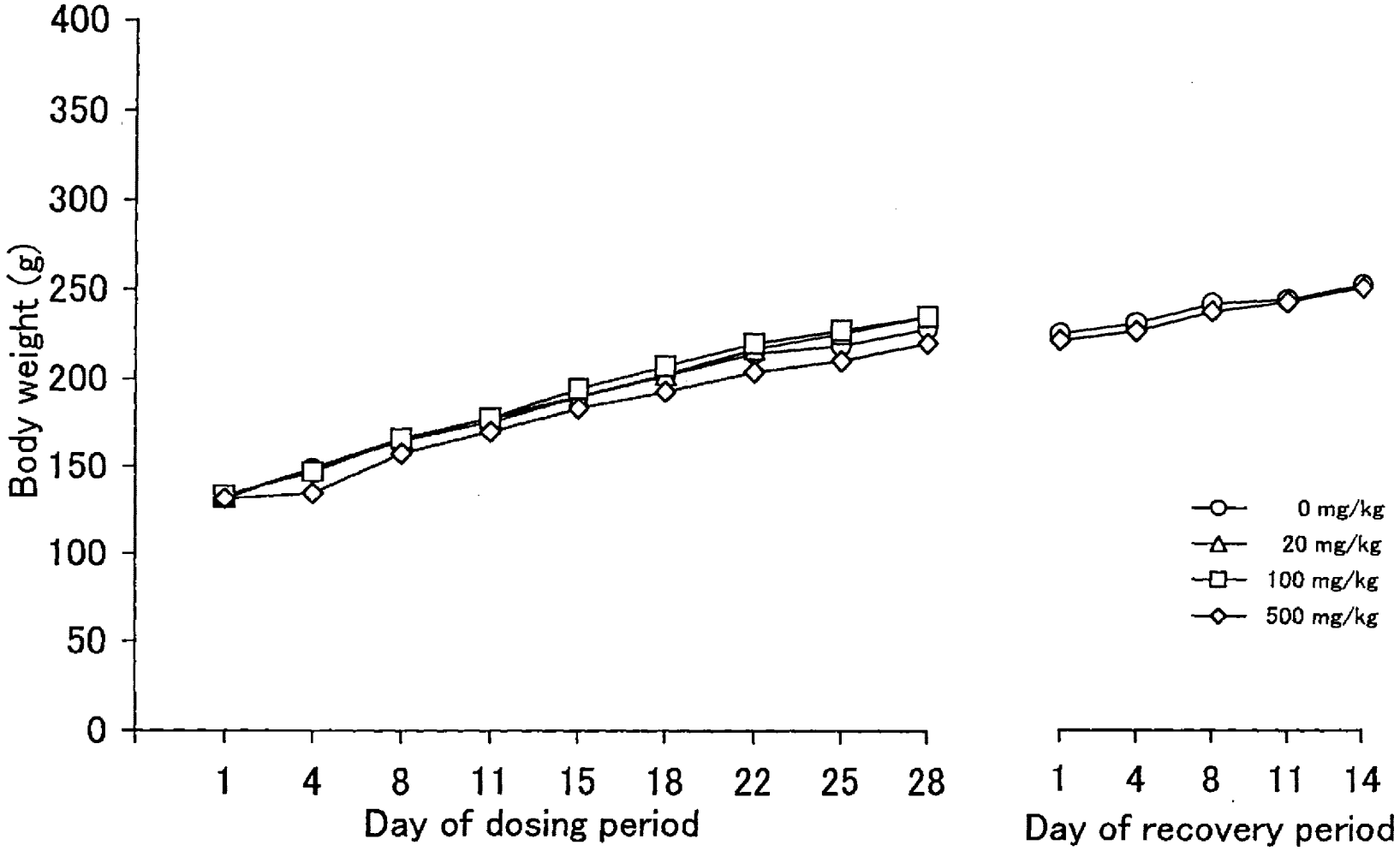


Fig. 1-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB in rats

Body weight changes in females

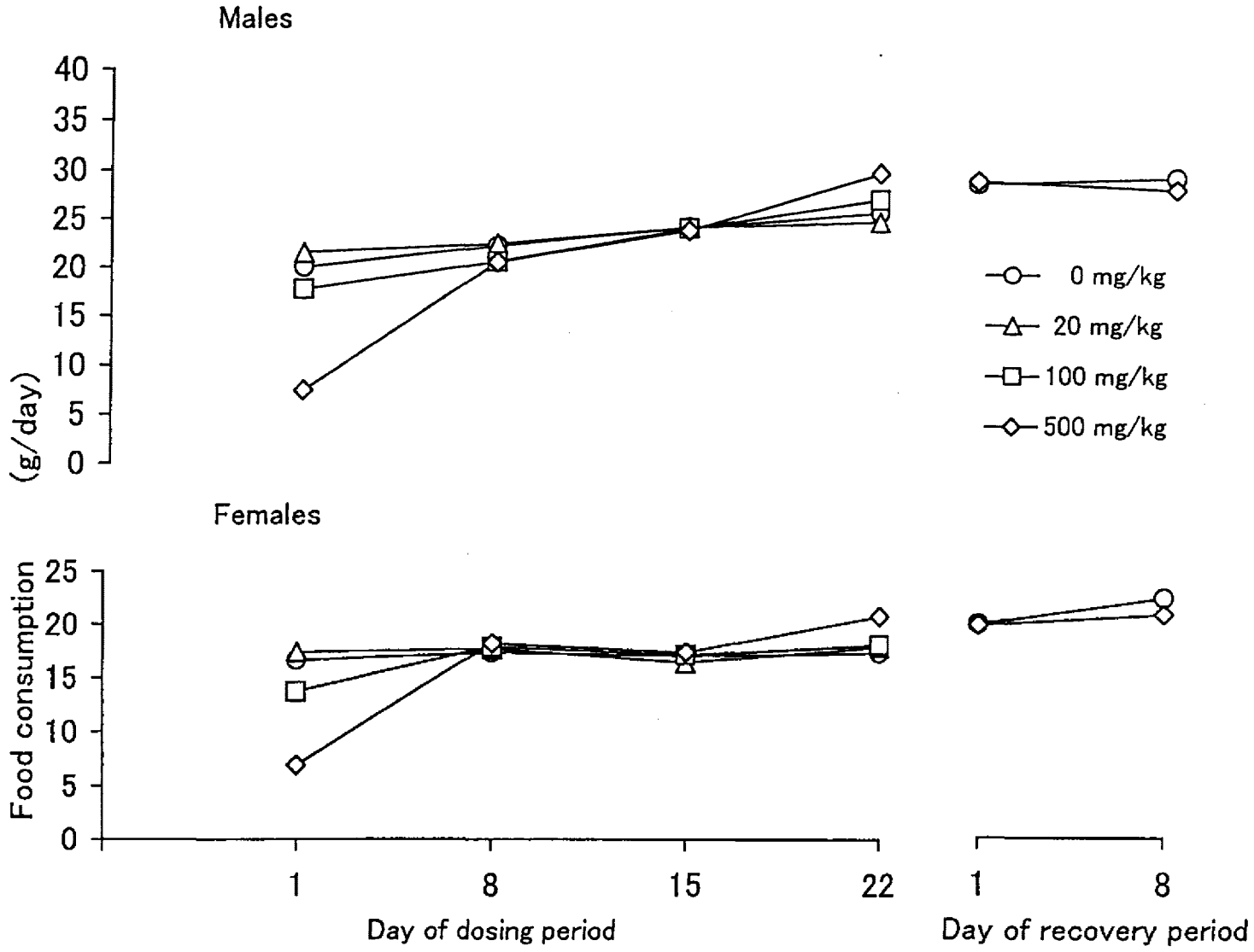


Fig. 2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB in rats

Food consumption in males and females

Table 1-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB in rats

Clinical signs in males

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs — Day of dosing period																												Day of recovery period[a]	
			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	1~14	Total
Salivation occurred just after administration (disappeared within about one hour)	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	3	-		3
	500	10	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	6	6	8	8	10	8	9	6	4	7	8	10	9	8	10	9	10	10		10
Salivation occurred just after administration (cotinuously observed for about one hour or more)	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	1	-	1	1	-	-	1		1
	500	10	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	2	1	2	4	-	1	-	-	1	-	-	-	-		4
Salivation was observed about one hour after administration or later	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	500	10	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		3
Lacrimation	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	500	10	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Decrease fecal volume	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		1
	500	10	-	10	10	10	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Soft feces	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		1
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	500	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reddish urine	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	500	10	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

a), recovery test was performed in 5 animals of the 0-mg/kg and 500-mg/kg group of both sexes.
-, no animal showed the sign.

Table 1-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB in rats

Clinical signs in females

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs — Day of dosing period																												Day of recovery period[a]	Total
			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	1–14	
Salivation occurred just after administration (disappeared within about one hour)	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	500	10	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5	5	5	4	7	5	5	5	5	6	4	6	7	7	6	6	6	5	6		10
Salivation occurred just after administration (cotinuously observed for about one hour or more)	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	500	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-	1		1
Salivation was observed about one hour after administration or later	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	500	10	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		2
Lacrimation	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	500	10	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Decrease fecal volume	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	500	10	-	10	10	10	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Soft feces	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	100	5	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		1
	500	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a), recovery test was performed in 5 animals of the 0-mg/kg and 500-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 DCB 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) 154.7 ±5.4	(10) 182.3 ±7.2	(10) 216.5 ±9.8	(10) 240.5 ±12.5	(10) 276.0 ±12.8	(10) 299.6 ±13.7	(10) 331.9 ±16.0	(10) 348.6 ±17.9	(10) 369.1 ±20.4	(5) 359.2 ±12.9	(5) 376.7 ±14.7	(5) 401.5 ±14.9	(5) 410.5 ±13.3	(5) 428.8 ±15.6
20	(5) 155.4 ±5.5	(5) 183.2 ±6.0	(5) 216.0 ±9.6	(5) 239.0 ±14.1	(5) 272.0 ±18.3	(5) 297.6 ±24.2	(5) 330.1 ±28.0	(5) 349.6 ±31.4	(5) 371.4 ±33.6					
100	(5) 152.0 ±5.9	(5) 172.2 ±7.4	(5) 201.1 ±18.2	(5) 225.4 ±18.3	(5) 263.1 ±21.1	(5) 290.1 ±23.9	(5) 323.2 ±28.0	(5) 344.4 ±33.3	(5) 365.1 ±35.2					
500	(10) 154.0 ±4.9	(10) 146.1** ±14.1	(10) 184.4** ±11.0	(10) 206.4** ±13.1	(10) 239.0** ±15.4	(10) 263.6** ±17.4	(10) 293.6** ±20.0	(10) 306.3** ±25.9	(10) 328.1** ±26.3	(5) 322.1* ±27.5	(5) 344.2* ±26.0	(5) 370.5 ±27.1	(5) 384.4 ±26.6	(5) 402.8 ±24.7

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

*, significantly different from control, P<0.05
**, signigicantly different from control, P<0.01

Table 2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB 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) 131.6 ±3.0	(10) 148.7 ±4.6	(10) 164.7 ±6.0	(10) 175.5 ±8.7	(10) 189.8 ±10.5	(10) 201.9 ±10.8	(10) 214.3 ±12.0	(10) 218.5 ±12.1	(10) 228.1 ±11.2	(5) 225.0 ±12.8	(5) 230.9 ±13.7	(5) 241.9 ±14.9	(5) 243.9 ±19.2	(5) 253.0 ±21.5
20	(5) 132.0 ±3.2	(5) 149.2 ±6.2	(5) 165.8 ±9.9	(5) 177.6 ±13.9	(5) 190.0 ±15.0	(5) 202.4 ±17.2	(5) 216.6 ±20.1	(5) 225.4 ±21.3	(5) 235.1 ±20.5					
100	(5) 133.4 ±4.3	(5) 147.1 ±5.5	(5) 166.0 ±6.4	(5) 177.8 ±7.0	(5) 194.5 ±9.0	(5) 207.2 ±9.9	(5) 219.9 ±15.1	(5) 227.4 ±11.8	(5) 235.0 ±16.2					
500	(10) 131.6 ±2.0	(10) 134.5** ±4.9	(10) 157.6 ±6.9	(10) 169.8 ±9.6	(10) 183.2 ±12.4	(10) 192.9 ±13.2	(10) 204.1 ±15.7	(10) 210.1 ±17.4	(10) 220.2 ±16.2	(5) 221.5 ±14.6	(5) 226.8 ±12.9	(5) 237.6 ±15.6	(5) 242.8 ±18.0	(5) 251.6 ±18.2

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

**, significantly different from control, $P<0.01$

Table 3-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB 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) 20.0 ±1.8	(10) 22.2 ±1.7	(10) 24.1 ±2.1	(10) 25.6 ±1.9	(5) 28.6 ±3.2	(5) 29.2 ±3.2
20	(5) 21.5 ±2.3	(5) 22.4 ±2.6	(5) 24.1 ±3.8	(5) 24.7 ±4.2		
100	(5) 17.7 ±2.0	(5) 20.6 ±3.0	(5) 24.0 ±2.9	(5) 27.0 ±3.0		
500	(10) 7.4** ±3.5	(10) 20.5 ±1.8	(10) 23.8 ±2.1	(10) 29.7 ±6.0	(5) 28.9 ±2.7	(5) 28.0 ±2.2

Parameter, mean(g)±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 DCB 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) 16.6 ±1.1	(10) 17.3 ±1.4	(10) 17.0 ±1.6	(10) 17.3 ±2.7	(5) 20.6 ±2.7	(5) 23.1 ±1.9
20	(5) 17.4 ±0.3	(5) 17.7 ±2.6	(5) 16.4 ±3.0	(5) 17.9 ±3.7		
100	(5) 13.7 ±1.0	(5) 17.9 ±1.9	(5) 17.1 ±2.5	(5) 18.1 ±2.7		
500	(10) 6.9** ±2.0	(10) 18.2 ±1.7	(10) 17.4 ±2.6	(10) 20.8* ±1.9	(5) 20.5 ±3.1	(5) 21.5 ±1.8

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

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

Table 4-1

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

Water consumption in males

Dose (mg/kg)	Day of dosing period	Day of recovery period
	23 day	9 day
0	(10) 31.3 ±11.8	(5) 39.9 ±10.4
20	(5) 40.2 ±10.4	
100	(5) 39.4 ±10.5	
500	(10) 31.3 ±10.2	(5) 32.8 ±5.8

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

Table 4-2

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

Water consumption in females

Dose (mg/kg)	Day of dosing period	Day of recovery period
	23 day	9 day
0	(10) 15.3 ±7.3	(5) 21.0 ±14.2
20	(5) 22.7 ±4.7	
100	(5) 26.9 ±11.0	
500	(10) 21.8 ±11.1	(5) 32.6 ±16.3

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

Table 5-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB in rats

Urinalysis in males and females on day 23 of dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Urinary volume (mL/24hr)	Specific gravity	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	15.8± 5.8[f]	1.051± 0.016[f]	10	0	10	0	0	0	0	0	3	1	6	0	0	7	3	10	1	6	3	10	10	0	0	0	0	6	4
	20	5	18.0± 9.6	1.045± 0.016	5	0	5	0	0	0	0	0	0	3	2	0	1	4	0	5	2	2	1	5	5	0	0	0	0	5	0
	100	5	17.0± 7.7	1.046± 0.013	4	1	5	0	0	0	0	0	0	1	4	0	1	4	0	5	1	3	1	5	5	0	0	0	0	3	2
	500	10	19.7± 6.4	1.041± 0.012	8	2	10	0	0	0	0	0	0	0	10	0	7	3	0	10	6	4	0	10	10	0	0	0	0	3	7
Female	0	10	8.2± 2.2	1.047± 0.017	10	0	9	0	1	0	1	1	1	1	6	6	0	4	0	10	9	1	0	10	9	0	0	0	1	7	3
	20	5	10.4± 4.8	1.045± 0.015	5	0	5	0	0	1	1	0	1	1	1	2	2	1	0	5	3	2	0	5	5	0	0	0	0	3	2
	100	5	15.6± 6.2*	1.030± 0.016	5	0	5	0	0	0	0	0	3	0	2	4	0	1	0	5	4	1	0	5	5	0	0	0	0	4	1
	500	10	11.0± 5.0	1.046± 0.016	9	1	10	0	0	0	0	1	0	0	9	6	3	1	0	10	7	2	1	10	10	0	0	0	0	4	6

a) ly, light yellow; y, yellow
b) −, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
c) −, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL
d) −, negative
e) ±, 0.1 E.U./dL; +, 1.0 E.U./dL
f) mean±S.D.
*, significantly different from control, $p<0.05$

Table 5-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB in rats

Urinalysis in males and females on day 9 of recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Urinary volume (mL/24hr)	Specific gravity	Color[a]	Turbidity[b]	pH					Protein[c]				Glucose[d]	Ketone[b]			Bilirubin[b]	Occult blood[b]	Urobilinogen[e]	
					ly	−	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	−	±	+	++	−	−	±	+	−	−	±	+
Male	0	5	25.5± 8.3[f]	1.047± 0.015[f]	5	5	1	2	1	1	0	0	2	2	1	5	2	2	1	5	5	4	1
	500	5	18.3± 4.9	1.053± 0.015	5	5	0	2	2	0	1	0	0	3	2	5	0	2	3	5	5	2	3
Female	0	5	14.1± 5.9	1.054± 0.021	5	5	1	1	1	1	1	3	1	1	0	5	4	1	0	5	5	3	2
	500	5	19.6±11.9	1.041± 0.014	5	5	2	1	1	1	0	5	0	0	0	5	5	0	0	5	5	4	1

a) ly, light 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
f) mean±S.D.

Table 6-1-1

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

Hematological findings in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4$/mm^3)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4$/mm^3)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 681 ±16	(5) 14.2 ±0.6	(5) 41.8 ±1.4	(5) 61.3 ±1.1	(5) 20.8 ±0.5	(5) 34.0 ±0.3	(5) 4.0 ±0.5	(5) 96.5 ±5.7	(5) 14.6 ±0.9	(5) 19.0 ±1.9
20	(5) 686 ±14	(5) 14.6 ±0.3	(5) 42.8 ±0.5	(5) 62.4 ±1.2	(5) 21.3 ±0.5	(5) 34.2 ±0.4	(5) 3.5 ±0.2	(5) 95.7 ±8.4	(5) 15.1 ±1.3	(5) 19.6 ±1.2
100	(5) 694 ±26	(5) 14.2 ±0.6	(5) 41.8 ±1.7	(5) 60.2 ±1.3	(5) 20.5 ±0.5	(5) 34.1 ±0.5	(5) 3.5 ±0.9	(5) 98.6 ±5.7	(5) 15.1 ±2.0	(5) 18.9 ±0.9
500	(5) 720 ±29	(5) 14.9 ±0.9	(5) 43.9 ±2.4	(5) 61.0 ±2.5	(5) 20.7 ±0.8	(5) 33.9 ±0.5	(5) 3.6 ±0.6	(5) 102.2 ±8.3	(5) 14.6 ±2.5	(5) 19.5 ±2.7

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100$/mm^3)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 69 ±19	(5) 0 ±0	(5) 9 ±4	(5) 0 ±0	(5) 0 ±0	(5) 5 ±2	(5) 86 ±6
20	(5) 59 ±8	(5) 0 ±0	(5) 11 ±2	(5) 0 ±1	(5) 0 ±0	(5) 4 ±3	(5) 85 ±4
100	(5) 67 ±15	(5) 0 ±0	(5) 12 ±5	(5) 1 ±1	(5) 0 ±0	(5) 4 ±2	(5) 84 ±6
500	(5) 70 ±22	(5) 0 ±0	(5) 13 ±4	(5) 0 ±0	(5) 0 ±0	(5) 6 ±3	(5) 81 ±5

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

Table 6-1-2

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

Hematological findings in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/mm^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/mm^3$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 665 ±41	(5) 13.5 ±1.1	(5) 39.5 ±2.6	(5) 59.5 ±1.4	(5) 20.4 ±1.1	(5) 34.2 ±1.2	(5) 2.5 ±1.0	(4) 99.3 ±12.2	(5) 11.5 ±0.2	(5) 17.3 ±1.7
20	(5) 704 ±26	(5) 14.4 ±0.5	(5) 42.2 ±1.4	(5) 60.0 ±1.8	(5) 20.4 ±0.6	(5) 34.0 ±0.3	(5) 2.2 ±0.3	(5) 102.3 ±11.3	(5) 11.4 ±0.3	(5) 16.9 ±1.2
100	(5) 691 ±34	(5) 14.2 ±0.4	(5) 41.4 ±1.6	(5) 59.9 ±1.2	(5) 20.5 ±0.5	(5) 34.3 ±0.6	(5) 2.4 ±0.5	(5) 95.3 ±4.7	(5) 11.5 ±0.3	(5) 16.7 ±1.5
500	(5) 719 ±30	(5) 14.4 ±0.6	(5) 42.3 ±2.0	(5) 58.8 ±1.0	(5) 20.0 ±0.5	(5) 34.0 ±0.5	(5) 3.3 ±1.7	(5) 99.9 ±8.4	(5) 11.3 ±0.3	(5) 17.7 ±2.0

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/mm^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 37 ±15	(5) 0 ±0	(5) 12 ±5	(5) 1 ±1	(5) 0 ±0	(5) 4 ±3	(5) 83 ±6
20	(5) 44 ±5	(5) 0 ±0	(5) 11 ±5	(5) 1 ±1	(5) 0 ±0	(5) 3 ±2	(5) 85 ±5
100	(5) 40 ±7	(5) 0 ±0	(5) 14 ±4	(5) 1 ±1	(5) 0 ±0	(5) 2 ±2	(5) 83 ±4
500	(5) 37 ±11	(5) 0 ±0	(5) 13 ±4	(5) 1 ±1	(5) 0 ±0	(5) 5 ±2	(5) 81 ±5

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

Table 6-2-1

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

Hematological findings in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4$/mm^3)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4$/mm^3)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 802 ±22	(5) 15.3 ±0.3	(5) 46.3 ±1.0	(5) 57.8 ±2.3	(5) 19.0 ±0.6	(5) 33.0 ±0.4	(5) 2.8 ±1.0	(5) 99.0 ±8.3	(5) 17.5 ±2.3	(5) 21.4 ±1.4
500	(5) 792 ±17	(5) 15.1 ±0.4	(5) 45.5 ±1.0	(5) 57.5 ±0.9	(5) 19.1 ±0.3	(5) 33.3 ±0.4	(5) 3.4 ±0.7	(5) 106.0 ±13.9	(5) 16.6 ±3.2	(5) 20.6 ±1.6

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100$/mm^3)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 80 ±17	(5) 0 ±0	(5) 9 ±4	(5) 1 ±1	(5) 0 ±0	(5) 6 ±3	(5) 84 ±8
500	(5) 102 ±29	(5) 0 ±0	(5) 9 ±4	(5) 0 ±0	(5) 0 ±0	(5) 6 ±2	(5) 85 ±4

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

Table 6-2-2

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

Hematological findings in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4$/mm^3)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4$/mm^3)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 743 ±43	(5) 14.6 ±0.4	(5) 43.2 ±2.1	(5) 58.2 ±0.9	(5) 19.7 ±0.6	(5) 33.8 ±0.8	(5) 2.7 ±0.5	(5) 101.3 ±12.0	(5) 11.4 ±0.3	(5) 14.6 ±1.3
500	(5) 742 ±14	(5) 14.4 ±0.3	(5) 42.1 ±1.2	(5) 56.7 ±1.6	(5) 19.4 ±0.6	(5) 34.2 ±0.2	(5) 2.3 ±0.3	(5) 115.4 ±12.3	(5) 11.1 ±0.5	(5) 15.9 ±1.7

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100$/mm^3)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 48 ±10	(5) 0 ±0	(5) 11 ±7	(5) 1 ±1	(5) 0 ±0	(5) 5 ±2	(5) 83 ±9
500	(5) 42 ±11	(5) 0 ±0	(5) 9 ±5	(5) 1 ±1	(5) 0 ±0	(5) 6 ±3	(5) 84 ±9

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

Table 7-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB 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)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5) 5.2 ±0.2	(5) 3.3 ±0.1	(5) 1.67 ±0.15	(5) 133 ±16	(5) 44 ±3	(5) 51 ±9	(5) 12 ±1	(5) 0.6 ±0.1	(5) 0.11 ±0.03
20	(5) 5.1 ±0.1	(5) 3.1 ±0.1	(5) 1.58 ±0.08	(5) 140 ±21	(5) 39 ±6	(5) 37 ±10	(5) 15 ±2	(5) 0.6 ±0.1	(5) 0.14 ±0.02
100	(5) 5.2 ±0.2	(5) 3.1 ±0.1	(5) 1.54 ±0.17	(5) 125 ±16	(5) 40 ±7	(5) 44 ±14	(5) 12 ±1	(5) 0.6 ±0.0	(5) 0.12 ±0.02
500	(5) 5.3 ±0.3	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.38** ±0.08	(5) 132 ±24	(5) 59* ±11	(5) 33 ±23	(5) 20** ±2	(5) 0.6 ±0.0	(5) 0.16 ±0.06

Dose (mg/kg)	Inorg. Phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 7.5 ±0.4	(5) 9.1 ±0.3	(5) 145.9 ±0.4	(5) 3.73 ±0.09	(5) 106.4 ±0.8	(5) 474 ±76	(5) 31 ±3	(5) 68 ±2	(5) 0 ±0
20	(5) 7.3 ±0.4	(5) 8.9 ±0.1	(5) 145.2 ±0.7	(5) 3.58 ±0.28	(5) 106.7 ±1.3	(5) 486 ±80	(5) 29 ±2	(5) 64 ±5	(5) 0 ±0
100	(5) 7.6 ±0.9	(5) 9.0 ±0.2	(5) 145.5 ±1.2	(5) 3.58 ±0.14	(5) 106.4 ±1.6	(5) 363* ±46	(5) 34 ±9	(5) 68 ±10	(5) 0 ±0
500	(5) 9.0* ±1.0	(5) 9.0 ±0.2	(5) 144.3* ±0.7	(5) 3.81 ±0.19	(5) 105.6 ±1.0	(5) 389 ±39	(5) 55 ±8	(5) 86** ±7	(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 DCB 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)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5) 5.5 ±0.3	(5) 3.4 ±0.2	(5) 1.60 ±0.17	(5) 121 ±18	(5) 42 ±8	(5) 19 ±6	(5) 18 ±2	(5) 0.5 ±0.0	(5) 0.10 ±0.01
20	(5) 5.1* ±0.1	(5) 3.0* ±0.1	(5) 1.48 ±0.18	(5) 121 ±28	(5) 47 ±12	(5) 21 ±9	(5) 19 ±2	(5) 0.6 ±0.1	(5) 0.10 ±0.01
100	(5) 5.2 ±0.1	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.50 ±0.15	(5) 114 ±17	(5) 53 ±10	(5) 25 ±9	(5) 17 ±2	(5) 0.5 ±0.0	(5) 0.11 ±0.02
500	(5) 5.5 ±0.3	(5) 3.2 ±0.2	(5) 1.45 ±0.14	(5) 119 ±14	(5) 74** ±17	(5) 22 ±5	(5) 19 ±3	(5) 0.6 ±0.1	(5) 0.12 ±0.02

Dose (mg/kg)	Inorg. Phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 6.7 ±0.4	(5) 8.6 ±0.1	(5) 144.6 ±1.3	(5) 3.51 ±0.24	(5) 108.0 ±1.5	(5) 235 ±49	(5) 25 ±2	(5) 66 ±7	(5) 0 ±1
20	(5) 6.5 ±0.4	(5) 8.4 ±0.2	(5) 143.8 ±1.6	(5) 3.54 ±0.44	(5) 108.0 ±2.0	(5) 260 ±50	(5) 21 ±2	(5) 62 ±6	(5) 0 ±0
100	(5) 7.4 ±0.7	(5) 8.7 ±0.2	(5) 144.9 ±0.2	(5) 3.50 ±0.33	(5) 106.6 ±0.9	(5) 228 ±35	(5) 24 ±4	(5) 64 ±8	(5) 0 ±1
500	(5) 7.2 ±0.8	(5) 8.7 ±0.2	(5) 143.9 ±1.8	(5) 3.61 ±0.19	(5) 107.4 ±0.9	(5) 222 ±39	(5) 37 ±10	(5) 70 ±11	(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 7-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB 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)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5) 5.5 ±0.2	(5) 3.1 ±0.1	(5) 1.32 ±0.08	(5) 164 ±21	(5) 48 ±8	(5) 51 ±10	(5) 16 ±2	(5) 0.7 ±0.1	(5) 0.08 ±0.04
500	(5) 5.4 ±0.2	(5) 3.1 ±0.1	(5) 1.32 ±0.14	(5) 137* ±12	(5) 50 ±10	(5) 53 ±24	(5) 17 ±2	(5) 0.6 ±0.1	(5) 0.08 ±0.03

Dose (mg/kg)	Inorg. Phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 7.2 ±0.6	(5) 8.8 ±0.2	(5) 144.7 ±1.0	(5) 4.01 ±0.15	(5) 105.1 ±1.4	(5) 283 ±47	(5) 30 ±4	(5) 59 ±6	(5) 0 ±0
500	(5) 7.7 ±0.4	(5) 8.9 ±0.3	(5) 144.6 ±0.7	(5) 4.09 ±0.09	(5) 105.7 ±1.2	(5) 299 ±39	(5) 34 ±5	(5) 67 ±4	(5) 0 ±0

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

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

Table 7-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB 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)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5) 5.8 ±0.3	(5) 3.4 ±0.2	(5) 1.42 ±0.11	(5) 127 ±15	(5) 58 ±11	(5) 33 ±8	(5) 20 ±3	(5) 0.7 ±0.1	(5) 0.11 ±0.01
500	(5) 5.9 ±0.4	(5) 3.4 ±0.4	(5) 1.39 ±0.17	(5) 132 ±29	(5) 69 ±19	(5) 30 ±5	(5) 20 ±3	(5) 0.7 ±0.1	(5) 0.10 ±0.03

Dose (mg/kg)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 5.0 ±0.5	(5) 8.9 ±0.1	(5) 144.0 ±0.9	(5) 3.83 ±0.17	(5) 107.0 ±1.3	(5) 182 ±46	(5) 23 ±3	(5) 58 ±6	(5) 0 ±0
500	(5) 5.8 ±0.8	(5) 9.2** ±0.1	(5) 143.3 ±1.1	(5) 3.92 ±0.36	(5) 106.5 ±1.7	(5) 187 ±42	(5) 25 ±2	(5) 61 ±6	(5) 0 ±0

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

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

Table 8-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB 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) 351.0 ±14.2	(5) 1932.2 ±75.9	(5) 604.1 ±98.3	(5) 1127.8 ±46.7	(5) 10922.0 ±649.0	(5) 2445.9 ±122.0	(5) 725.3 ±75.8	(5) 53.6 ±7.9	(5) 3123.8 ±272.2	(5) 749.1 ±56.9
20	(5) 341.3 ±32.7	(5) 1848.0 ±103.6	(5) 498.7 ±87.1	(5) 1075.8 ±132.8	(5) 10731.0 ±1455.1	(5) 2515.3 ±191.9	(5) 701.0 ±123.7	(5) 61.3 ±9.1	(5) 2873.1 ±97.2	(5) 665.8 ±42.3
100	(5) 332.6 ±30.8	(5) 1843.0 ±40.8	(5) 531.8 ±92.3	(5) 1115.9 ±73.9	(5) 11934.2 ±1438.8	(5) 2608.0 ±131.9	(5) 663.9 ±89.4	(5) 49.5 ±5.4	(5) 2854.4 ±144.2	(5) 664.4* ±58.6
500	(5) 296.8** ±15.5	(5) 1835.1 ±41.3	(5) 422.0* ±93.5	(5) 976.0* ±47.5	(5) 13372.1** ±652.8	(5) 2663.7 ±111.5	(5) 508.2** ±68.6	(5) 44.6 ±8.9	(5) 2827.9 ±223.9	(5) 639.8* ±44.1

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

*: significantly different from control, $p<0.05$
**: 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 DCB 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) 218.6 ±9.1	(5) 1805.9 ±90.7	(5) 521.4 ±175.7	(5) 750.1 ±78.7	(5) 6576.0 ±400.7	(5) 1675.8 ±125.0	(5) 479.0 ±30.7	(5) 60.7 ±7.1	(5) 96.0 ±16.9
20	(5) 216.2 ±20.6	(5) 1741.7 ±78.0	(5) 562.2 ±113.1	(5) 709.1 ±82.9	(5) 6724.8 ±1027.0	(5) 1688.5 ±131.1	(5) 548.5 ±96.0	(5) 54.7 ±2.7	(5) 83.2 ±8.3
100	(5) 216.5 ±12.6	(5) 1799.1 ±40.4	(5) 456.4 ±141.3	(5) 726.9 ±32.7	(5) 6956.7 ±800.8	(5) 1658.1 ±178.2	(5) 510.6 ±73.3	(5) 60.4 ±13.9	(5) 91.1 ±19.2
500	(5) 197.2 ±19.8	(5) 1704.0 ±27.9	(5) 459.8 ±132.4	(5) 706.9 ±99.4	(5) 9092.9** ±1141.0	(5) 1698.5 ±205.0	(5) 423.1 ±142.2	(5) 54.6 ±8.4	(5) 83.2 ±15.2

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

**, 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 DCB 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	(5) 393.5 ±12.7	(5) 1889.1 ±101.1	(5) 444.0 ±52.1	(5) 1187.8 ±93.8	(5) 11535.6 ±533.0	(5) 2747.0 ±210.4	(5) 676.8 ±92.2	(5) 63.1 ±12.9	(5) 2972.2 ±312.9	(5) 960.5 ±89.8
500	(5) 369.4 ±20.6	(5) 1859.1 ±46.3	(5) 457.5 ±59.7	(5) 1130.8 ±72.4	(5) 11168.6 ±883.1	(5) 2569.9 ±164.7	(5) 643.9 ±46.5	(5) 52.1 ±1.7	(5) 3009.5 ±85.4	(5) 931.5 ±52.9

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 DCB 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) 232.3 ±17.3	(5) 1839.0 ±54.2	(5) 408.3 ±68.1	(5) 774.2 ±79.8	(5) 6519.9 ±547.1	(5) 1703.4 ±179.6	(5) 509.9 ±87.4	(5) 68.7 ±11.2	(5) 89.2 ±14.2
500	(5) 230.3 ±15.8	(5) 1763.4* ±45.1	(5) 486.1 ±78.5	(5) 748.9 ±44.2	(5) 6959.2 ±247.5	(5) 1680.4 ±86.3	(5) 530.4 ±86.4	(5) 67.7 ±5.3	(5) 93.2 ±10.2

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 DCB 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) 351.0 ±14.2	(5) 5.518 ±0.411	(5) 1.720 ±0.256	(5) 3.215 ±0.119	(5) 31.112 ±1.074	(5) 6.970 ±0.222	(5) 2.063 ±0.144	(5) 0.152 ±0.018	(5) 8.914 ±0.858	(5) 2.142 ±0.246
20	(5) 341.3 ±32.7	(5) 5.448 ±0.527	(5) 1.460 ±0.192	(5) 3.148 ±0.190	(5) 31.344 ±1.564	(5) 7.385 ±0.333	(5) 2.042 ±0.198	(5) 0.179 ±0.015	(5) 8.487 ±0.951	(5) 1.969 ±0.275
100	(5) 332.6 ±30.8	(5) 5.572 ±0.415	(5) 1.608 ±0.277	(5) 3.363 ±0.123	(5) 35.826** ±1.475	(5) 7.890* ±0.766	(5) 2.010 ±0.311	(5) 0.150 ±0.022	(5) 8.645 ±0.959	(5) 2.010 ±0.241
500	(5) 296.8** ±15.5	(5) 6.201 ±0.447	(5) 1.429 ±0.348	(5) 3.289 ±0.069	(5) 45.063** ±1.035	(5) 8.999** ±0.713	(5) 1.711 ±0.195	(5) 0.150 ±0.024	(5) 9.550 ±0.939	(5) 2.165 ±0.238

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 DCB 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) 218.6 ±9.1	(5) 8.268 ±0.437	(5) 2.388 ±0.823	(5) 3.429 ±0.291	(5) 30.076 ±1.040	(5) 7.659 ±0.248	(5) 2.192 ±0.112	(5) 0.278 ±0.034	(5) 0.441 ±0.087
20	(5) 216.2 ±20.6	(5) 8.121 ±0.889	(5) 2.589 ±0.395	(5) 3.279 ±0.209	(5) 31.002 ±2.172	(5) 7.826 ±0.369	(5) 2.527 ±0.238	(5) 0.255 ±0.029	(5) 0.389 ±0.061
100	(5) 216.5 ±12.6	(5) 8.328 ±0.454	(5) 2.120 ±0.709	(5) 3.361 ±0.155	(5) 32.056 ±2.091	(5) 7.642 ±0.430	(5) 2.357 ±0.283	(5) 0.277 ±0.051	(5) 0.420 ±0.079
500	(5) 197.2 ±19.8	(5) 8.708 ±0.812	(5) 2.303 ±0.471	(5) 3.578 ±0.252	(5) 46.228** ±5.097	(5) 8.613** ±0.579	(5) 2.133 ±0.616	(5) 0.277 ±0.032	(5) 0.422 ±0.062

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

**, 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 DCB 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) 393.5 ±12.7	(5) 4.806 ±0.316	(5) 1.130 ±0.138	(5) 3.022 ±0.268	(5) 29.326 ±1.262	(5) 6.978 ±0.438	(5) 1.723 ±0.255	(5) 0.160 ±0.031	(5) 7.573 ±0.961	(5) 2.445 ±0.265
500	(5) 369.4 ±20.6	(5) 5.041 ±0.194	(5) 1.243 ±0.188	(5) 3.064 ±0.166	(5) 30.237 ±1.637	(5) 6.960 ±0.288	(5) 1.746 ±0.139	(5) 0.141 ±0.005	(5) 8.176 ±0.640	(5) 2.524 ±0.119

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

Table 9-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DCB 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) 232.3 ±17.3	(5) 7.948 ±0.581	(5) 1.752 ±0.205	(5) 3.335 ±0.274	(5) 28.116 ±2.253	(5) 7.326 ±0.404	(5) 2.186 ±0.222	(5) 0.297 ±0.052	(5) 0.386 ±0.065
500	(5) 230.3 ±15.8	(5) 7.686 ±0.567	(5) 2.109 ±0.286	(5) 3.258 ±0.182	(5) 30.304 ±1.817	(5) 7.319 ±0.523	(5) 2.297 ±0.294	(5) 0.294 ±0.006	(5) 0.405 ±0.033

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

Table 10-1-1

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

Macroscopical findings in males at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg		20 mg/kg		100 mg/kg		500 mg/kg	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Dark	5	0	5	0	5	0	3	2
Enlargement	5	0	5	0	5	0	3	2
(Kidney)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	4	1
Soft	5	0	5	0	5	0	4	1
(Spleen)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Pale	5	0	5	0	5	0	3	2
Small	5	0	5	0	5	0	4	1
(Thoracic cavity)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Nodule	5	0	5	0	4	1	5	0

-, 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 DCB in rats

Macroscopical findings in females at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg		20 mg/kg		100 mg/kg		500 mg/kg	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Dark	5	0	5	0	5	0	4	1
Enlargement	5	0	5	0	4	1	3	2
(Kidney)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Cyst	5	0	5	0	4	1	5	0
(Spleen)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Dark	5	0	5	0	5	0	4	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 DCB in rats

Histological findings in males at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg							20 mg/kg							100 mg/kg								500 mg/kg							
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.			-	±	+	++	+++	Pos.	
(Liver)	[5]							[5]							[5]								[5]							
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular		5	0	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0		0	3	2	0	0	5	##		0	0	1	3	1	5	##
Single cell necrosis, centrilobular		5	0	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0		1	4	0	0	0	4	#		0	5	0	0	0	5	##
Fatty change, periportal		0	5	0	0	0	5		0	4	1	0	0	5		1	4	0	0	0	4			5	0	0	0	0	0	##
Necrosis, focal		4	1	0	0	0	1		5	0	0	0	0	0		3	2	0	0	0	2			3	2	0	0	0	2	
(Kidney)	[5]							[5]							[5]								[5]							
Eosinophilic body, proximal tubule		5	0	0	0	0	0		4	1	0	0	0	1		4	1	0	0	0	1			4	1	0	0	0	1	
Inclusion body, intracytoplasmic, eosinophilic, proximal tubule		5	0	0	0	0	0		4	1	0	0	0	1		1	0	4	0	0	4	#		0	1	3	1	0	5	##
Basophilic tubule		0	5	0	0	0	5		0	5	0	0	0	5		0	5	0	0	0	5			1	4	0	0	0	4	
Cast, proteinous		3	2	0	0	0	2		4	1	0	0	0	1		5	0	0	0	0	0			5	0	0	0	0	0	
Cellular infiltration, lymphocyte		1	4	0	0	0	4		0	5	0	0	0	5		1	4	0	0	0	4			1	4	0	0	0	4	
(Spleen)	[5]																						[5]							
Deposit, pigment, brown		0	3	2	0	0	5																	0	2	3	0	0	5	
Hematopoiesis, extramedullary		0	1	4	0	0	5																	0	0	5	0	0	5	
(Adrenal gland)	[5]																						[5]							
No abnormalities																														
(Stomach)	[5]																						[5]							
No abnormalities																														
(Heart)	[5]																						[5]							
No abnormalities																														
(Testis)	[5]																						[5]							
No abnormalities																														
(Epididymis)	[5]																						[5]							
No abnormalities																														
(Thymus)	[5]																						[5]							
No abnormalities																														
(Pancreas)	[5]																						[5]							
No abnormalities																														
(Thoracic cavity)															[1]															
Granuloma, foreign body																0	0	1	0	0	1									

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

[ ], number of animals examined.

**, significantly different from control, $p<0.01$ (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 11-1-2

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

Histological findings in females at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg						20 mg/kg						100 mg/kg						500 mg/kg						
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]						
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2	0	1	1	3	0	** 5	##
Single cell necrosis, centrilobular	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3	
Fatty change, periportal	0	5	0	0	0	5	0	4	1	0	0	5	0	5	0	0	0	5	2	3	0	0	0	3	
(Kidney)	[5]												[1]						[5]						
Basophilic tubule	0	5	0	0	0	5							0	1	0	0	0	1	1	4	0	0	0	4	
Cast, proteinous	5	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	
Cellular infiltration, lymphocyte	1	4	0	0	0	4							0	1	0	0	0	1	2	3	0	0	0	3	
Cyst, cortex	5	0	0	0	0	0							0	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0	
(Spleen)	[5]																		[5]						
Deposit, pigment, brown	0	0	5	0	0	5													0	0	5	0	0	5	
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	0	0	0	5													0	5	0	0	0	5	
(Adrenal gland)	[5]																		[5]						
No abnormalities																									
(Stomach)	[5]																		[5]						
No abnormalities																									
(Heart)	[5]																		[5]						
No abnormalities																									
(Ovary)	[5]																		[5]						
No abnormalities																									
(Pancreas)	[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, $p<0.01$ (One-tailed Fisher exact test).

Table 11-2-1

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

Histological findings in males at the end of recovery period

Dose	0 mg/kg						500 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver) [5]							[5]					
Single cell necrosis, centrilobular	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
Fatty change, periportal	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5
(Kidney) [5]							[5]					
Eosinophilic body, proximal tubule	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
Basophilic tubule	0	5	0	0	0	5	1	4	0	0	0	4
Cellular infiltration, lymphocyte	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5

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

[ ], number of animals examined.

Table 11-2-2

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

Histological findings in females at the end of recovery period

Dose	0 mg/kg						500 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]					
Fatty change, periportal	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5

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

[ ], number of animals examined.