

# 1,2,4-トリメチル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

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 1,2,4-Trimethylbenzene in Rats

### 要約

1,2,4-トリメチルベンゼンは、トリメリット酸、ビタミンEなどの合成用、染料、顔料、医薬品の中間体、メチル化してデュレンを経てピロメリット酸の合成原料として広く使用されている。当物質をラットに5 ml/kg経口投与した場合には3/10例死亡するとの報告<sup>1)</sup>があるが、反復投与毒性に関する報告は皆無に等しい。今回、既存化学物質の毒性を評価するために、当物質を雌雄ラットに1日1回、28日間反復経口投与し、その毒性について検討した。一部の動物については、14日間の回復期間を設けた。投与量は、1000 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3により300、100 および30 mg/kgとした。なお、対照として媒体(コーンオイル)投与群を設けた。

死亡は、いずれの群にも発現しなかった。一般状態観察において、300 mg/kg以上の群の雌雄で投与直後に流涎がみられた。

体重は、1000 mg/kg群の雌雄で増加抑制がみられた。回復期間中には、1000 mg/kg群の雌雄とも体重は低値で推移した。

摂餌量は、各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様に推移した。

摂水量は、300 mg/kg群の雄と1000 mg/kg群の雌雄で増加がみられた。回復期間中には、1000 mg/kg群の雌雄とも摂水量は高値で推移した。

尿検査において、1000 mg/kg群の雌雄で尿量の高値がみられた。この変動は、回復期間終了前には消失した。

血液学検査において、各投与群の雌雄とも各検査項目に投与による変動はみられなかった。

血液生化学検査において、各投与群の雌雄とも各検査項目に投与による変動はみられなかった。

剖検では、いずれの群の雌雄とも異常はみられなかった。

器官重量において、雄では300 mg/kg以上の群で腎臓の相対重量の高値、1000 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値および腎臓の絶対重量の高値がみられた。雌では、300 mg/kg以上の群で肝臓の絶対・相対重量の高値、1000 mg/kg群で腎臓の相対重量の高値がみられた。これらの変動は、回復期間終了時には消失した。

病理組織学的検査において、雄では300 mg/kg以上の群で腎臓に尿細管の硝子滴変性がみられた。この変化は、回復期間終了時には消失した。雌では、投与による変化はみられなかった。

以上のことから、当試験条件下における1,2,4-トリメチルベンゼンの28日間反復経口投与による毒性学的無影響量は、雌雄とも100 mg/kg/dayと考えられる。

### 方法

#### 1. 被験物質、媒体および投与検体

被験物質の1,2,4-トリメチルベンゼン(CAS No.95-63-6)は、分子量：120.20、融点：-43.9℃、沸点：169.4℃、比重：0.88で水に難溶、有機溶媒に易溶の無色透明の液体である(Lot No.H5-CH-11、製造元：東洋合成工業(株)、純度：98.75%)。入手後は、室温・遮光下で気密容器に入れて保管した。投与期間終了後に被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、純度は98.64%であり、使用期間中の安定性が確認された。

被験物質は秤取し、コーンオイルに溶解して必要濃度の投与検体を調製した。なお、0.6、2および20%濃度の調製液は、室温・遮光・気密条件下で7日間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため、各濃度の調製液は調製後、室温・遮光・気密条件下で保管し、調製後7日以内に使用した。また、被験物質は純度換算しないで、投与量は原体重量で表示した。

#### 2. 使用動物および飼育条件

Sprague-Dawley系ラット [Crj:CD(SD), (SPF)] を雄は4週齢、雌は3週齢で日本チャールス・リバー(株)から購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後、雄は7日間、雌は14日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常の認められない6週齢の動物を群分けして試験に用いた。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始の前日に行った。1群の動物数は、雌雄各10あるいは15匹とした。

動物は、室温20~24℃、湿度40~70%、明暗各12時間(照明：午前6時~午後6時)、換気回数12回/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージを用いて個別飼育した。

飼料は固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))を、飲料水は水道水をいずれも自由に摂取させた。なお、剖検前日の午後4時から絶食とした。

## 3. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

1,2,4-トリメチルベンゼンは、継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたプラスチック製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。

投与期間は、1日1回で28日間反復投与とした。また、28日間の投与後に一部の動物について14日間の回復期間を設けた。なお、投与開始日を投与1日とし、最終投与日の翌日を回復1日とした。投与開始日の週齢は6週齢であり、体重範囲は雄が154~180 g、雌が133~165 gであった。

投与量は、先に実施した雄ラットを用いた2週間投与による予備試験(投与段階: 0, 62.5, 125, 250, 500および1000 mg/kg, 各群5例)の結果により決定した。すなわち、125 mg/kg以上の群で投与直後に流涎がみられたのみで、各群とも死亡発現はなく、体重推移および剖検でも異常はみられなかった。そこで、当試験の投与量は、1000 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3で300, 100および30 mg/kgとした。また、対照として被験物質と同一液量の媒体(コーンオイル)を投与する群を設けた。

1群の動物数は、対照群および1000 mg/kg群では投与期間終了時剖検例雌雄各10匹と回復期間終了時剖検例雌雄各5匹の雌雄各15匹とした。また、30, 100および300 mg/kg群では、投与期間終了時剖検例雌雄各10匹とした。

## 4. 観察および検査項目

## 1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与期間中には投与前・後の1日2回ならびに回復期間中には毎日1回観察した。

## 2) 体重測定

体重は、投与期間中および回復期間中とも1週間に2回測定した。

## 3) 摂餌量測定

摂餌量は、投与期間中および回復期間中ともに1週間に1回測定した。

## 4) 摂水量測定

摂餌量測定と同様にして摂水量を測定した。

## 5) 尿検査

投与期間終了前に投与期間終了時の剖検用動物を、回復期間終了前に回復期間終了時の剖検用動物について実施した。すなわち、採尿ケージを用いて絶食・給水で3時間で採取した尿(3時間尿)と引き続いて給餌・給水で21時間で採取した尿(21時間尿)ならびにそれらを合計した尿(24時間尿)について、以下の検査を実施した。

3時間尿: 色調は、外観判定とした。pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンは、エームスクリニテック用検査紙(マイルス・三共(株))に尿を滴下後にエームス尿分析器(クリニテック200, マイルス・三共(株))を用いて検査した。尿沈渣は、沈渣を尿沈渣染色液で染色後に顕微鏡下で観察した。なお、投与期間中の採尿は、当日の検体投与後に行った。

21時間尿: 比重を屈折率により屈折型尿比重計(ユリベット・II D, (株)ニコン)を用いて測定した。

24時間尿: 尿量を比重と重量から算出した。

## 6) 血液学検査

最終投与の翌日および回復期間終了後に、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から血液を採取し、以下の検査を実施した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数および白血球数(WBC)は、EDTA-2KコーティングしたSysmexサンプルカップに採取した血液について、多項目自動血球計数装置(Sysmex E-2000, 東亜医用電子(株))を用いて測定した。さらに、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)および平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。

網状赤血球数は、EDTA-2K処理した血液をBrecher法により超生体染色してスライドガラスに塗抹後、Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の数を計数した。

白血球百分率は、EDTA-2K処理した血液をスライドガラスに塗抹し、May-Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

プロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)は、3.13%クエン酸ナトリウムで処理した血漿について、散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスタールII, 三共(株))を用いて測定した。

## 7) 血液生化学検査

血液学的検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液を遠心分離し、得られた血清について、以下の検査を実施した。

GOTおよびGPTはHenry変法、ALPはp-NPP基質法、 $\gamma$ -GTPは $\gamma$ -G-P-NA基質法、総蛋白はBiuret法、総ビリルビンはAzobilirubin法、尿素窒素(BUN)はUrease・GIDH法、クレアチニンはJaffé法、ブドウ糖はGlucose dehydrogenase法、総コレステロールはCOD・DAOS法、トリグリセライドはGPO・DAOS法、Caはo-CPC法、無機リンはMolybdenum blue法により、自動分析装置(AU 500, オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

NaおよびKはイオン選択電極法により、Clは電量滴定法により、いずれも全自動電解質分析装置(EA04, (株)A & T)を用いて測定した。

蛋白分画は、電気泳動法により自動電気泳動装置(AES 600, オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

アルブミン量は総蛋白量および蛋白分画値から、A/G

比は蛋白分画値から算出した。

## 8) 剖検

上記の6)および7)の項で採血した動物をさらに放血致死させた後に器官・組織の肉眼的観察を行った。

## 9) 器官重量の測定

剖検時に以下の器官重量を測定した。さらに、剖検前に測定した体重を基準として器官重量の体重比(相対重量)を算出した。

脳(大脳, 小脳, 延髄), 胸腺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣および精巣上体または卵巣。

## 10) 病理組織学的検査

以下の器官または組織を摘出して10%中性緩衝ホルマリン液(ただし、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリン液)で固定し、全例について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。

心臓, 肺, 肝臓, 胃, 脾臓, 胸腺, 腎臓, 膀胱, 精巣, 精巣上体, 卵巣, 下垂体, 副腎, 甲状腺(上皮小体を含む), 脳(大脳, 小脳, 延髄), 眼球, 骨髄(大腿骨)。

投与期間終了時剖検例の対照群および1000 mg/kg群の心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓および副腎についてH-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。さらに、投与期間終了時の1000 mg/kg群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた肝臓は30, 100および300 mg/kg群ならびに回復期間終了時の対照群および1000 mg/kg群の雌雄について、腎臓は30, 100および300 mg/kg群ならびに回復期間終了時の対照群および1000 mg/kg群の雄について同様に検査した。

## 5. 統計解析

体重, 摂餌量, 摂水量, 尿量, 尿比重, 血液学検査, 血液生化学検査, 器官重量(相対重量を含む)について

は、各群で平均値および標準偏差を算出した。有意差検定は対照群と各投与群との間で多重比較検定を用いて行い、危険率5%未満を有意とした。すなわち、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散ならば一元配置法による分散分析<sup>2)</sup>を行い、有意ならばDunnett法<sup>3)</sup>またはScheffé法<sup>4)</sup>を用いて行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定<sup>5)</sup>)を行い、有意ならば順位を利用したDunnett法またはScheffé法を用いて行った。なお、病理組織学的検査において、1000 mg/kg群で毒性学的影響が示唆された器官・組織については、対照群との群間比較を上記の順位を利用したDunnett法またはScheffé法を用いて行った。さらに対照群との間に有意差が認められた所見については、Cochran・Armitageの傾向検定を用いて用量反応性を確認した。

## 結果

### 1. 一般状態

投与期間中には、対照群および100 mg/kg以下の群の雌雄とも異常症状はみられなかった。300 mg/kg以上の群の雌雄では、投与後に流涎がみられた。流涎は、300 mg/kg群の雄で投与7日、雌で投与20日、1000 mg/kg群の雄で投与2日、雌で投与3日からみられ、300 mg/kg群の雌雄では少数例～約半数例、1000 mg/kg群の雌雄では全例に認められた。

回復期間中には、対照群および1000 mg/kg群の雌雄とも異常症状はみられなかった。

### 2. 体重推移 (Fig.1)

投与期間中には、300 mg/kg以下の群の雌雄は対照群とはほぼ同様の体重推移であり、いずれの測定日も有意差はみられなかった。1000 mg/kg群の雄では、対照群と比べて投与4日頃から体重増加抑制傾向がみられ、投

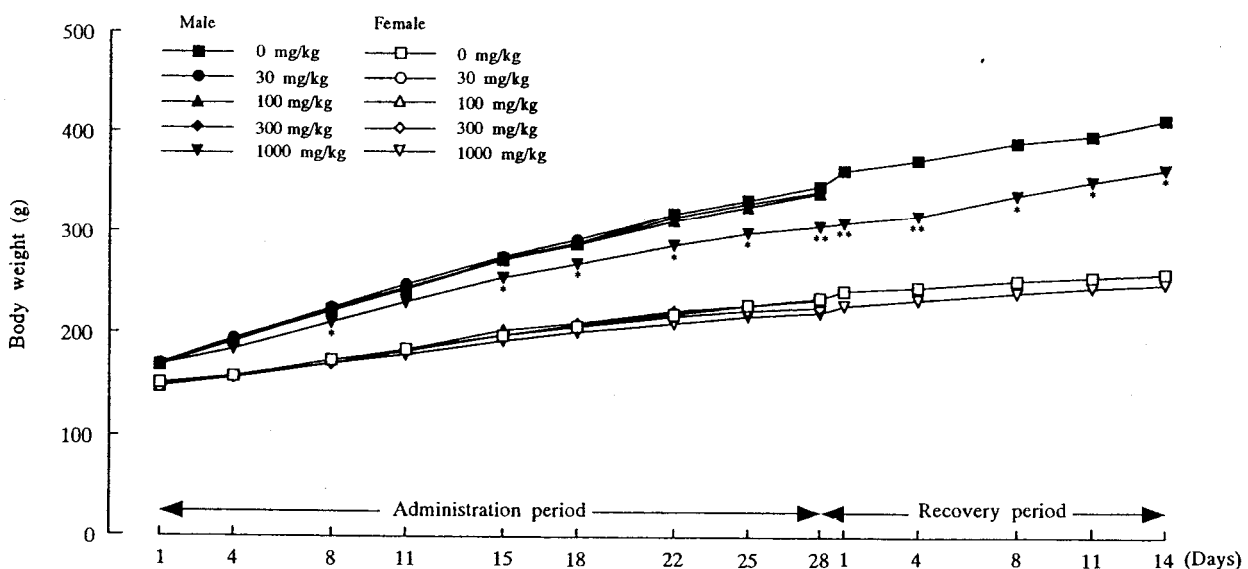


Fig. 1 Body weight of male and female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 1,2,4-trimethylbenzene. Significantly different from control (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

与8日と投与15日から最終投与日まで体重の有意な低値が認められた。1000 mg/kg群の雌では、対照群と比べて有意な差ではないが、投与25日頃から最終投与日まで体重増加抑制傾向がみられた。

回復期間中には、1000 mg/kg群の雄では対照群と比べて回復1日から回復14日まで体重の有意な低値がみられた。1000 mg/kg群の雌では、対照群と比べて有意な差ではないが、回復期間を通して体重の低値傾向がみられた。

### 3. 摂餌量

投与期間中には、各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様の摂餌量であり、いずれの測定日とも有意差はみられなかった。

回復期間中には、1000 mg/kg群の雌雄では対照群とほぼ同様の摂餌量であり、いずれの測定日とも有意差はみられなかった。

### 4. 摂水量

投与期間中には、100 mg/kg以下の群の雄および300 mg/kg以下の群の雌では対照群とほぼ同様の摂水量であり、いずれの測定日とも有意差はみられなかった。300 mg/kg群の雄では、対照群と比べて投与17および24日に摂水量の有意な高値がみられた。1000 mg/kg群の雄では、対照群と比べて投与10日から投与24日まで摂水量の有意な高値がみられた。1000 mg/kg群の雌では、対照群と比べて投与3、17および24日に摂水量の有意な高値が認められた。

回復期間中には、1000 mg/kg群の雄では回復3日に摂水量の高値傾向がみられた。1000 mg/kg群の雌では、対照群と比べて回復3および10日に摂水量の有意な高値が認められた。

### 5. 尿検査

投与期間終了前には、300 mg/kg以下の群の雌雄では対照群と比べて尿量および比重に有意差はみられなかった。1000 mg/kg群の雌雄では、対照群と比べて尿量の有意な高値がみられた。なお、色調、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンおよび沈渣は、各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同程度であった。

回復期間終了前には、尿量および尿比重は1000 mg/kg群の雌雄とも対照群と比べて有意差はみられなかった。また、色調、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンおよび沈渣は、1000 mg/kg群の雌雄とも対照群とほぼ同程度であった。

### 6. 血液学検査(Table 1, 2)

投与期間終了時には、100 mg/kg群の雄で対照群と比べて好酸球率の有意な高値がみられたが、投与量に依存した変化ではなかった。なお、300 mg/kg以下の群の雌雄では、対照群と比べてその他の測定項目に有意差はみられなかった。1000 mg/kg群の雄では、対照群と比べて

てヘモグロビン量の有意な高値がみられた。1000 mg/kg群の雌では、対照群と比べて血小板数の有意な低値がみられた。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雄では対照群と比べていずれの測定項目とも有意差はみられなかった。1000 mg/kg群の雌では、対照群と比べて活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮がみられた。

### 7. 血液生化学検査(Table 3, 4)

投与期間終了時には、30 mg/kg群の雄および100 mg/kg以下の群の雌では対照群と比べていずれの測定項目とも有意差はみられなかった。300 mg/kg以上の群の雄では対照群と比べてアルブミン率、A/G比およびKの有意な高値、 $\alpha_1$ -グロブリン率の有意な低値、1000 mg/kg群の雄では総ビリルビンおよびNaの有意な低値がみられた。その他に100 mg/kg群の雄では、対照群と比べてGOTの有意な低値がみられたが、投与量に依存した変化ではなかった。また、300 mg/kg群の雄では、対照群と比べて総蛋白およびブドウ糖の有意な低値がみられたが、投与量に依存した変化ではなかった。300 mg/kg以上の群の雌では対照群と比べて総コレステロールの有意な高値、1000 mg/kg群の雌ではGPTおよび $\alpha_2$ -グロブリン率の有意な高値、 $\alpha_1$ -グロブリン率、 $\alpha_3$ -グロブリン率および総ビリルビンの有意な低値がみられた。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雄では対照群と比べていずれの測定項目とも有意差はみられなかった。1000 mg/kg群の雌では、対照群と比べて尿素窒素の有意な高値がみられた。

### 8. 剖検

投与期間終了時および回復期間終了時には、いずれの群の雌雄とも異常はみられなかった。

### 9. 器官重量(Table 5, 6)

投与期間終了時には、100 mg/kg以下の群の雌雄では対照群と比べていずれの器官重量とも有意差はみられなかった。300 mg/kg以上の群の雄では対照群に比べて腎臓の相対重量の有意な高値、1000 mg/kg群の雄では肝臓の相対重量の有意な高値、腎臓の絶対重量の有意な高値、有意差はないが肝臓の絶対重量の高値傾向がみられた。その他には、1000 mg/kg群の雄で対照群と比べて脾臓の絶対重量の有意な低値、脳、精巣および精巣上体の相対重量の有意な高値がみられたが、絶対重量と相対重量で一定方向の変動ではないもの、もしくは軽度の差であるものであった。300 mg/kg以上の群の雌では、対照群に比べて肝臓の絶対・相対重量の有意な高値、1000 mg/kg群の雌では腎臓の相対重量の有意な高値、有意差はないが腎臓の絶対重量の高値傾向がみられた。その他には、1000 mg/kg群の雌で対照群と比べて脳の相対重量の有意な高値がみられたが、軽度な差であった。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雄では対照群と比べて脳、脾臓および精巣の相対重量の有意な高値が

Table 1 Hematological examination of male rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 1, 2, 4-trimethylbenzene

Test period	Termination of administration period					Termination of recovery period	
	0	30	100	300	1000	0	1000
Dose (mg/kg)							
Number of males	10	10	10	10	10	5	5
RBC ( $10^4/\text{mm}^3$ )	784.5 ± 36.6	784.2 ± 33.6	778.5 ± 24.3	777.4 ± 29.3	799.4 ± 23.1	840.8 ± 30.2	845.8 ± 13.1
Hemoglobin (g/dl)	14.84 ± 0.54	14.90 ± 0.72	14.91 ± 0.30	14.85 ± 0.44	15.59 ± 0.46**	15.22 ± 0.28	15.20 ± 0.33
Hematocrit (%)	45.26 ± 2.14	45.17 ± 1.91	45.01 ± 0.83	45.30 ± 1.09	47.18 ± 1.44	45.24 ± 0.82	45.22 ± 1.27
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	57.72 ± 2.01	57.62 ± 1.23	57.85 ± 1.49	58.31 ± 1.83	59.04 ± 1.33	53.84 ± 1.14	53.48 ± 1.96
MCH (pg)	18.93 ± 0.58	19.02 ± 0.37	19.18 ± 0.36	19.12 ± 0.60	19.52 ± 0.58	18.14 ± 0.39	17.98 ± 0.36
MCHC (g/dl)	32.80 ± 0.65	32.99 ± 0.50	33.12 ± 0.42	32.79 ± 0.78	33.06 ± 0.48	33.64 ± 0.44	33.62 ± 0.79
Platelet ( $10^4/\text{mm}^3$ )	133.39 ± 14.75	132.32 ± 14.00	126.61 ± 15.08	120.83 ± 14.28	121.29 ± 8.96	120.44 ± 13.75	108.08 ± 4.51
Reticulocyte (%)	27.3 ± 3.7	27.9 ± 5.4	26.0 ± 5.1	28.9 ± 6.7	26.5 ± 5.7	28.6 ± 1.5	27.4 ± 6.9
PT (sec.)	14.65 ± 1.54	16.20 ± 2.57	16.89 ± 1.91	14.80 ± 2.59	14.86 ± 2.08	14.40 ± 1.80	16.46 ± 1.63
APTT (sec.)	27.23 ± 2.24	28.58 ± 2.77	29.27 ± 2.46	27.60 ± 3.67	29.61 ± 2.72	24.88 ± 2.65	26.12 ± 1.17
WBC ( $10^2/\text{mm}^3$ )	56.0 ± 8.8	56.0 ± 14.7	50.6 ± 13.2	52.9 ± 10.0	60.4 ± 18.4	69.4 ± 14.7	84.4 ± 16.6
Differential leukocyte (%)							
Lymphocyte	92.3 ± 3.2	93.2 ± 2.8	92.6 ± 3.3	93.4 ± 2.8	92.7 ± 3.2	95.8 ± 1.1	94.6 ± 3.0
Neutrophil	7.3 ± 3.4	6.6 ± 2.7	6.3 ± 3.1	5.9 ± 2.9	6.6 ± 3.1	3.6 ± 1.1	5.0 ± 2.8
Eosinophil	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.6 ± 0.5*	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.0 ± 0.0
Basophil	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Monocyte	0.3 ± 0.5	0.1 ± 0.3	0.5 ± 0.7	0.6 ± 0.7	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.5

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (\*:p<0.05, \*\*:p<0.01).

Table 2 Hematological examination of female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 1, 2, 4-trimethylbenzene

Test period	Termination of administration period					Termination of recovery period	
	0	30	100	300	1000	0	1000
Dose (mg/kg)							
Number of females	10	10	10	10	10	5	5
RBC ( $10^4/\text{mm}^3$ )	751.9 ± 32.3	743.4 ± 35.3	757.5 ± 22.9	743.7 ± 20.4	749.9 ± 34.6	798.2 ± 14.3	797.8 ± 21.1
Hemoglobin (g/dl)	14.38 ± 0.52	14.32 ± 0.53	14.23 ± 0.49	14.35 ± 0.33	14.48 ± 0.68	14.90 ± 0.16	14.80 ± 0.60
Hematocrit (%)	42.9 ± 1.29	42.69 ± 1.35	42.42 ± 1.32	42.85 ± 0.68	43.36 ± 1.66	43.70 ± 0.53	43.12 ± 1.50
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	57.13 ± 1.55	57.47 ± 1.76	56.00 ± 0.85	57.66 ± 1.49	57.86 ± 1.46	54.76 ± 1.57	54.04 ± 0.92
MCH (pg)	19.15 ± 0.50	19.27 ± 0.62	18.79 ± 0.29	19.29 ± 0.56	19.32 ± 0.50	18.64 ± 0.44	18.58 ± 0.41
MCHC (g/dl)	33.51 ± 0.62	33.55 ± 0.73	33.54 ± 0.18	33.49 ± 0.72	33.39 ± 0.46	34.06 ± 0.28	34.32 ± 0.26
Platelet ( $10^4/\text{mm}^3$ )	108.49 ± 34.49	110.96 ± 6.58	116.72 ± 14.92	102.56 ± 11.95	91.62 ± 11.58**	121.82 ± 8.76	123.66 ± 20.92
Reticulocyte (%)	25.9 ± 4.9	24.3 ± 4.4	25.4 ± 6.4	26.6 ± 5.9	24.4 ± 3.2	24.8 ± 2.8	31.2 ± 8.7
PT (sec.)	12.61 ± 0.46	12.62 ± 0.32	12.17 ± 0.36	12.52 ± 0.23	12.36 ± 0.54	12.60 ± 0.23	12.48 ± 0.50
APTT (sec.)	19.84 ± 1.46	20.27 ± 1.65	20.65 ± 1.79	20.39 ± 0.89	20.78 ± 1.63	21.50 ± 0.80	19.78 ± 1.22*
WBC ( $10^2/\text{mm}^3$ )	45.6 ± 14.4	41.4 ± 10.5	47.7 ± 11.3	42.2 ± 9.7	52.3 ± 20.0	66.0 ± 15.3	58.6 ± 18.4
Differential leukocyte (%)							
Lymphocyte	94.0 ± 3.4	93.2 ± 4.7	95.0 ± 2.0	93.5 ± 2.8	93.5 ± 3.3	95.8 ± 1.6	95.2 ± 1.9
Neutrophil	5.4 ± 2.8	6.1 ± 4.1	4.5 ± 2.0	5.9 ± 2.3	5.9 ± 3.1	3.8 ± 1.3	3.6 ± 1.1
Eosinophil	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.8 ± 0.8
Basophil	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Monocyte	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.5

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (\*:p<0.05, \*\*:p<0.01).

Table 3 Blood chemical examination of male rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 1, 2, 4-trimethylbenzene

Test period	Termination of administration period					Termination of recovery period	
	0	30	100	300	1000	0	1000
Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000	0	1000
Number of males	10	10	10	10	10	5	5
GOT (IU/l)	84.13 ± 23.46	72.69 ± 6.90	64.47 ± 7.23**	73.87 ± 12.77	69.07 ± 10.12	67.92 ± 5.06	66.38 ± 7.41
GPT (IU/l)	27.21 ± 11.18	21.63 ± 2.88	22.27 ± 4.39	23.24 ± 3.58	24.23 ± 3.29	24.44 ± 1.40	25.46 ± 3.34
ALP (IU/l)	171.29 ± 16.15	181.03 ± 28.69	187.27 ± 24.46	191.57 ± 17.38	191.19 ± 31.87	133.68 ± 18.20	143.60 ± 14.97
γ-GTP (IU/l)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
T-protein (g/dl)	5.33 ± 0.16	5.29 ± 0.23	5.17 ± 0.25	5.04 ± 0.22**	5.20 ± 0.14	5.36 ± 0.09	5.26 ± 0.27
Albumin (g/dl)	3.013 ± 0.152	3.028 ± 0.071	2.965 ± 0.148	2.945 ± 0.095	3.090 ± 0.083	2.944 ± 0.045	2.926 ± 0.170
Protein fraction (%)							
Albumin	56.51 ± 1.54	57.30 ± 1.93	57.35 ± 1.81	58.45 ± 1.87*	59.45 ± 1.29**	54.94 ± 0.86	55.62 ± 2.25
α <sub>1</sub> -globulin	20.11 ± 1.20	19.04 ± 1.99	18.88 ± 1.66	17.63 ± 1.57**	16.86 ± 1.50**	20.50 ± 1.20	19.64 ± 2.23
α <sub>2</sub> -globulin	5.88 ± 0.48	5.97 ± 0.54	6.02 ± 0.36	6.02 ± 0.47	6.34 ± 0.69	5.76 ± 0.27	5.74 ± 0.63
α <sub>3</sub> -globulin	5.32 ± 0.83	5.34 ± 0.35	5.36 ± 0.38	5.16 ± 0.40	4.97 ± 0.45	5.74 ± 0.61	5.96 ± 0.36
β-globulin	10.18 ± 0.53	10.35 ± 0.51	10.27 ± 0.77	10.57 ± 0.57	10.25 ± 0.70	10.60 ± 0.41	10.84 ± 0.21
γ-globulin	2.00 ± 0.37	2.00 ± 0.48	2.12 ± 0.53	2.17 ± 0.54	2.13 ± 0.68	2.46 ± 0.38	2.20 ± 0.63
A/G ratio	1.301 ± 0.085	1.346 ± 0.111	1.350 ± 0.098	1.411 ± 0.108*	1.469 ± 0.079**	1.220 ± 0.041	1.258 ± 0.116
T-bilirubin (mg/dl)	0.055 ± 0.010	0.054 ± 0.011	0.047 ± 0.008	0.053 ± 0.011	0.042 ± 0.009*	0.068 ± 0.015	0.064 ± 0.011
BUN (mg/dl)	12.51 ± 1.99	13.49 ± 2.40	12.01 ± 2.60	13.01 ± 2.53	12.95 ± 2.80	18.02 ± 2.14	15.04 ± 2.21
Creatinine (mg/dl)	0.458 ± 0.033	0.451 ± 0.032	0.442 ± 0.037	0.439 ± 0.021	0.423 ± 0.037	0.566 ± 0.046	0.518 ± 0.018
Glucose (mg/dl)	119.85 ± 7.98	118.76 ± 12.23	108.53 ± 12.36	107.45 ± 9.11*	112.35 ± 10.37	126.44 ± 13.79	123.48 ± 8.37
T-cholesterol (mg/dl)	48.11 ± 9.53	46.61 ± 6.85	50.87 ± 8.90	47.65 ± 6.01	49.88 ± 8.47	49.72 ± 5.67	43.38 ± 9.14
Triglyceride (mg/dl)	35.41 ± 15.64	29.05 ± 7.92	34.55 ± 14.45	27.72 ± 7.94	23.42 ± 5.59	38.36 ± 6.56	44.06 ± 21.19
Na (mEq/l)	146.16 ± 1.08	146.03 ± 1.55	146.29 ± 0.76	145.26 ± 1.37	144.75 ± 0.96*	144.12 ± 1.21	144.68 ± 0.88
K (mEq/l)	4.365 ± 0.286	4.432 ± 0.256	4.433 ± 0.160	4.668 ± 0.251*	4.772 ± 0.285**	4.604 ± 0.183	4.432 ± 0.167
Cl (mEq/l)	105.82 ± 1.35	106.16 ± 1.53	106.00 ± 1.10	105.86 ± 0.70	104.69 ± 1.02	104.48 ± 1.14	105.10 ± 0.73
Ca (mg/dl)	10.43 ± 0.23	10.34 ± 0.23	10.28 ± 0.20	10.16 ± 0.27	10.26 ± 0.22	9.66 ± 0.11	9.72 ± 0.33
I-phosphate (mg/dl)	8.21 ± 0.85	8.54 ± 0.47	8.43 ± 0.65	8.54 ± 0.69	8.21 ± 0.44	7.46 ± 0.54	7.68 ± 0.43

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (\*:p&lt;0.05, \*\*:p&lt;0.01).

Table 4 Blood chemical examination of female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 1, 2, 4-trimethylbenzene

Test period	Termination of administration period					Termination of recovery period	
	0	30	100	300	1000	0	1000
Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000	0	1000
Number of males	10	10	10	10	10	5	5
GOT (IU/l)	66.22 ± 14.48	67.93 ± 9.11	61.33 ± 6.43	60.08 ± 9.32	61.33 ± 8.27	52.74 ± 4.26	47.70 ± 4.77
GPT (IU/l)	17.71 ± 2.87	18.15 ± 1.76	17.44 ± 2.19	17.87 ± 2.82	21.91 ± 1.98**	19.78 ± 3.03	16.96 ± 1.04
ALP (IU/l)	101.37 ± 12.49	97.41 ± 12.26	98.22 ± 15.08	94.68 ± 20.76	114.67 ± 19.38	71.48 ± 12.21	71.78 ± 11.18
γ-GTP (IU/l)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
T-protein (g/dl)	5.55 ± 0.23	5.44 ± 0.38	5.52 ± 0.40	5.25 ± 0.29	5.48 ± 0.43	5.84 ± 0.27	5.44 ± 0.34
Albumin (g/dl)	3.349 ± 0.197	3.236 ± 0.296	3.358 ± 0.327	3.181 ± 0.260	3.395 ± 0.311	3.380 ± 0.257	3.176 ± 0.125
Protein fraction (%)							
Albumin	60.31 ± 1.94	59.45 ± 2.31	60.76 ± 2.36	60.55 ± 2.24	61.94 ± 1.79	57.82 ± 1.88	58.48 ± 1.59
α <sub>1</sub> -globulin	16.36 ± 1.43	16.47 ± 1.60	16.86 ± 1.43	15.61 ± 1.56	13.91 ± 1.85**	19.66 ± 1.09	19.76 ± 1.39
α <sub>2</sub> -globulin	4.63 ± 0.54	5.22 ± 0.79	4.66 ± 0.58	5.40 ± 0.79	5.80 ± 1.13**	4.06 ± 0.26	3.86 ± 0.57
α <sub>3</sub> -globulin	5.24 ± 0.63	4.95 ± 0.62	4.80 ± 0.82	4.80 ± 0.54	4.21 ± 0.43**	5.40 ± 0.47	5.12 ± 0.57
β-globulin	10.05 ± 0.76	10.73 ± 0.83	9.61 ± 0.82	10.53 ± 0.97	10.80 ± 0.66	9.78 ± 0.93	9.80 ± 0.61
γ-globulin	3.41 ± 0.87	3.18 ± 0.71	3.31 ± 0.47	3.11 ± 0.95	3.34 ± 0.59	3.28 ± 0.53	2.98 ± 0.54
A/G ratio	1.524 ± 0.115	1.474 ± 0.148	1.557 ± 0.153	1.540 ± 0.143	1.633 ± 0.123	1.372 ± 0.111	1.410 ± 0.093
T-bilirubin (mg/dl)	0.075 ± 0.017	0.069 ± 0.016	0.064 ± 0.014	0.058 ± 0.008	0.049 ± 0.007**	0.080 ± 0.020	0.076 ± 0.005
BUN (mg/dl)	14.83 ± 2.05	14.21 ± 1.24	13.71 ± 2.53	13.85 ± 2.82	13.15 ± 2.48	16.42 ± 1.05	18.32 ± 0.95*
Creatinine (mg/dl)	0.488 ± 0.034	0.487 ± 0.030	0.487 ± 0.016	0.492 ± 0.029	0.475 ± 0.033	0.532 ± 0.020	0.512 ± 0.022
Glucose (mg/dl)	130.27 ± 15.68	125.77 ± 10.84	125.21 ± 9.79	120.96 ± 11.34	136.80 ± 13.35	130.76 ± 8.50	130.50 ± 9.64
T-cholesterol (mg/dl)	51.90 ± 9.00	58.59 ± 12.47	54.34 ± 10.88	66.84 ± 12.67*	75.94 ± 9.59**	55.82 ± 12.86	64.24 ± 7.93
Triglyceride (mg/dl)	24.25 ± 8.90	20.99 ± 6.18	23.57 ± 11.94	19.43 ± 7.80	21.53 ± 4.00	25.46 ± 5.96	26.12 ± 5.02
Na (mEq/l)	144.01 ± 1.56	144.11 ± 0.39	144.15 ± 1.36	143.31 ± 1.32	143.04 ± 1.41	143.56 ± 0.42	143.82 ± 1.19
K (mEq/l)	4.338 ± 0.403	4.349 ± 0.217	4.241 ± 0.087	4.242 ± 0.273	4.328 ± 0.239	3.616 ± 0.092	3.570 ± 0.223
Cl (mEq/l)	106.67 ± 1.68	107.04 ± 1.16	105.74 ± 1.23	105.80 ± 0.86	105.62 ± 1.48	106.50 ± 0.92	105.62 ± 1.52
Ca (mg/dl)	9.84 ± 0.33	9.81 ± 0.19	10.00 ± 0.29	9.90 ± 0.24	9.90 ± 0.31	10.46 ± 0.18	10.34 ± 0.21
I-phosphate (mg/dl)	6.40 ± 0.95	6.55 ± 0.75	6.81 ± 0.80	6.67 ± 0.51	6.61 ± 0.56	5.20 ± 0.64	5.86 ± 0.29

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (\*:p&lt;0.05, \*\*:p&lt;0.01).

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 1, 2, 4-trimethylbenzene

Test period	Termination of administration period					Termination of recovery period		
	Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000	0	1000
Number of males		10	10	10	10	10	5	5
Body weight (g)		323.0 ± 25.5	324.9 ± 40.5	320.5 ± 16.2	320.8 ± 18.5	289.2 ± 22.2*	385.8 ± 34.0	337.0 ± 14.6*
Brain (g)		1.916 ± 0.069	1.915 ± 0.051	1.881 ± 0.056	1.912 ± 0.074	1.891 ± 0.065	1.932 ± 0.025	1.946 ± 0.050
(g%)		0.595 ± 0.036	0.597 ± 0.074	0.588 ± 0.023	0.598 ± 0.043	0.656 ± 0.044*	0.504 ± 0.046	0.580 ± 0.040*
Thymus (g)		0.546 ± 0.084	0.486 ± 0.058	0.476 ± 0.098	0.516 ± 0.093	0.484 ± 0.125	0.550 ± 0.107	0.418 ± 0.088
(g%)		0.169 ± 0.023	0.153 ± 0.023	0.147 ± 0.028	0.162 ± 0.025	0.167 ± 0.037	0.142 ± 0.023	0.126 ± 0.027
Heart (g)		1.121 ± 0.124	1.186 ± 0.122	1.172 ± 0.083	1.150 ± 0.089	1.056 ± 0.146	1.226 ± 0.049	1.196 ± 0.087
(g%)		0.348 ± 0.032	0.366 ± 0.025	0.365 ± 0.018	0.357 ± 0.027	0.364 ± 0.027	0.318 ± 0.024	0.358 ± 0.038
Liver (g)		9.440 ± 1.025	9.567 ± 1.529	9.578 ± 0.777	9.842 ± 0.681	10.571 ± 0.803	10.370 ± 1.251	9.808 ± 1.120
(g%)		2.918 ± 0.144	2.937 ± 0.141	2.986 ± 0.126	3.066 ± 0.048	3.658 ± 0.132**	2.686 ± 0.175	2.902 ± 0.235
Spleen (g)		0.614 ± 0.078	0.592 ± 0.099	0.571 ± 0.049	0.626 ± 0.110	0.506 ± 0.091*	0.650 ± 0.066	0.644 ± 0.030
(g%)		0.189 ± 0.020	0.184 ± 0.026	0.179 ± 0.014	0.196 ± 0.037	0.172 ± 0.021	0.170 ± 0.010	0.190 ± 0.012*
Kidneys (g)		2.391 ± 0.181	2.374 ± 0.264	2.414 ± 0.175	2.590 ± 0.137	2.638 ± 0.255*	2.646 ± 0.091	2.594 ± 0.228
(g%)		0.742 ± 0.047	0.732 ± 0.057	0.753 ± 0.041	0.809 ± 0.040*	0.915 ± 0.064**	0.690 ± 0.060	0.772 ± 0.075
Adrenals (mg)		51.96 ± 9.95	56.20 ± 4.11	49.81 ± 5.52	50.30 ± 5.97	50.81 ± 8.33	54.44 ± 5.89	47.58 ± 4.96
(mg%)		16.09 ± 2.83	17.50 ± 2.34	15.54 ± 1.47	15.80 ± 2.51	17.65 ± 3.19	14.18 ± 1.68	14.14 ± 1.71
Testes (g)		3.051 ± 0.144	3.054 ± 0.217	3.037 ± 0.146	3.006 ± 0.195	3.036 ± 0.193	3.074 ± 0.170	3.198 ± 0.156
(g%)		0.948 ± 0.065	0.953 ± 0.138	0.948 ± 0.038	0.938 ± 0.071	1.055 ± 0.085*	0.802 ± 0.089	0.952 ± 0.090*
Epididymides (g)		0.736 ± 0.050	0.743 ± 0.043	0.757 ± 0.070	0.756 ± 0.038	0.745 ± 0.041	1.014 ± 0.061	0.974 ± 0.047
(g%)		0.231 ± 0.025	0.231 ± 0.028	0.237 ± 0.018	0.236 ± 0.013	0.259 ± 0.017*	0.264 ± 0.030	0.290 ± 0.020

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (\*:p<0.05, \*\*:p<0.01).

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 1, 2, 4-trimethylbenzene

Test period	Termination of administration period					Termination of recovery period		
	Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000	0	1000
Number of females		10	10	10	10	10	5	5
Body weight (g)		216.2 ± 18.9	217.7 ± 13.4	217.8 ± 14.0	211.5 ± 15.9	202.4 ± 12.2	239.2 ± 11.9	226.2 ± 8.8
Brain (g)		1.792 ± 0.068	1.814 ± 0.086	1.786 ± 0.060	1.790 ± 0.049	1.818 ± 0.051	1.834 ± 0.029	1.826 ± 0.039
(g%)		0.834 ± 0.072	0.835 ± 0.045	0.823 ± 0.052	0.851 ± 0.057	0.901 ± 0.058*	0.768 ± 0.051	0.806 ± 0.041
Thymus (g)		0.526 ± 0.097	0.539 ± 0.107	0.547 ± 0.074	0.510 ± 0.086	0.475 ± 0.066	0.476 ± 0.021	0.456 ± 0.028
(g%)		0.243 ± 0.037	0.246 ± 0.042	0.252 ± 0.039	0.240 ± 0.031	0.236 ± 0.038	0.200 ± 0.010	0.202 ± 0.015
Heart (g)		0.823 ± 0.101	0.794 ± 0.053	0.826 ± 0.089	0.772 ± 0.063	0.782 ± 0.082	0.870 ± 0.034	0.876 ± 0.113
(g%)		0.383 ± 0.068	0.365 ± 0.029	0.380 ± 0.024	0.366 ± 0.020	0.387 ± 0.031	0.364 ± 0.021	0.388 ± 0.052
Liver (g)		6.487 ± 0.726	6.539 ± 0.452	6.763 ± 0.571	7.367 ± 0.463*	9.019 ± 0.931**	6.908 ± 0.221	6.608 ± 0.315
(g%)		2.997 ± 0.178	3.004 ± 0.110	3.105 ± 0.161	3.491 ± 0.222**	4.448 ± 0.259**	2.892 ± 0.114	2.918 ± 0.042
Spleen (g)		0.480 ± 0.049	0.508 ± 0.073	0.470 ± 0.063	0.489 ± 0.067	0.416 ± 0.035	0.522 ± 0.101	0.476 ± 0.038
(g%)		0.224 ± 0.023	0.233 ± 0.032	0.217 ± 0.027	0.232 ± 0.027	0.207 ± 0.015	0.220 ± 0.049	0.212 ± 0.013
Kidneys (g)		1.667 ± 0.122	1.621 ± 0.114	1.669 ± 0.168	1.606 ± 0.090	1.722 ± 0.188	1.712 ± 0.090	1.682 ± 0.120
(g%)		0.774 ± 0.055	0.745 ± 0.052	0.767 ± 0.050	0.763 ± 0.043	0.849 ± 0.055**	0.716 ± 0.048	0.742 ± 0.030
Adrenals (mg)		64.41 ± 4.74	59.57 ± 3.46	63.28 ± 5.85	58.56 ± 7.72	66.97 ± 8.01	68.42 ± 9.86	69.40 ± 8.87
(mg%)		29.91 ± 2.47	27.43 ± 1.84	29.15 ± 3.25	27.91 ± 4.72	33.10 ± 3.31	28.50 ± 3.09	30.62 ± 3.10
Ovaries (mg)		85.84 ± 10.71	86.46 ± 9.81	87.67 ± 11.41	83.65 ± 13.93	78.76 ± 13.51	90.98 ± 11.48	87.88 ± 10.85
(mg%)		39.84 ± 4.74	39.69 ± 3.45	40.32 ± 5.06	39.61 ± 6.46	38.89 ± 6.07	38.14 ± 5.65	38.84 ± 4.33

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (\*:p<0.05, \*\*:p<0.01).

Table 7 Histopathological examination of male rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 1, 2, 4-trimethylbenzene

Test period	Termination of administration period					Termination of recovery period		
	Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000	0	1000
Number of males	10	10	10	10	10	5	5	
Finding	Grade	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+
Liver								
Vacuolar degeneration of periportal hepatocytes		1 0 4 4 1	0 3 6 1 0	1 8 1 0 0*	4 5 1 0 0*	9 1 0 0 0*	4 1 0 0 0	2 3 0 0 0
Cell infiltration		10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	9 1 0 0 0	10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0
Degeneration and necrosis of hepatocytes		10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	9 1 0 0 0	10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0
Focal necrosis		10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 1 0 0 0
Kidney								
Hyaline droplet degeneration		8 2 0 0 0	3 7 0 0 0	3 7 0 0 0	2 5 3 0 0*	0 2 7 1 0**	3 2 0 0 0	5 0 0 0 0
Basophilic change of urinary tubules		10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	5 0 0 0 0	4 1 0 0 0

Grade of histopathological finding; -:No abnormality detected, ±:Slight, +:Mild, 2+:Moderate, 3+:Marked.  
 No remarkable changes were recognized in heart, spleen and adrenal of control group and 1000 mg/kg group.  
 Significantly different from control (\*:p<0.05, \*\*:p<0.01).

Table 8 Histopathological examination of female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 1,2,4-trimethylbenzene

Test period	Termination of administration period					Termination of recovery period		
	Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000	0	1000
Number of males	10	10	10	10	10	5	5	
Finding	Grade	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+	- ± + 2+ 3+
Liver								
Vacuolar degeneration of periportal hepatocytes		0 6 3 1 0	1 4 5 0 0	1 8 1 0 0	0 10 0 0 0	3 7 0 0 0*	1 4 0 0 0	3 2 0 0 0
Cell infiltration		10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	10 0 0 0 0	9 1 0 0 0	10 0 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0
Kidney								
Basophilic change of urinary tubules		10 0 0 0 0	/	/	/	9 1 0 0 0	5 0 0 0 0	5 0 0 0 0

Grade of histopathological finding; -:No abnormality detected, ±:Slight, +:Mild, 2+:Moderate, 3+:Marked.  
 No remarkable changes were recognized in heart, spleen and adrenal of control group and 1000 mg/kg group.  
 /:Not examined.  
 Significantly different from control (\*:p<0.05).

みられたが、絶対重量と相対重量で一定方向の変動ではないもの、もしくは軽度の差であるものであった。1000 mg/kg群の雌では、対照群と比べていずれの器官重量とも有意差はみられなかった。

10. 病理組織学的検査 (Table 7, 8)

投与期間終了時には、肝臓において門脈周囲の肝細胞の空胞変性が雄では対照群で9例、30 mg/kg群で10例、100 mg/kg群で9例、300 mg/kg群で6例、1000 mg/kg群で1例にみられ、投与量が増えるに従い出現例数は減少し、その程度も弱かった。この変化は、対照群と比べて100 mg/kg以上の群で有意差が認められ、また、用量相関性も確認された。この変化は、雌では対照群で10例、30 mg/kg群で9例、100 mg/kg群で9例、300 mg/kg群で10例、1000 mg/kg群で7例にみられ、1000

mg/kg群で有意差が認められた。なお、その他に、肝臓に認められた所見は、いずれも程度はごく軽度であり、かつ投与量に依存した変化ではなかった。腎臓において、尿管の硝子滴変性が雄では対照群で2例、30 mg/kg群で7例、100 mg/kg群で7例、300 mg/kg群で8例、1000 mg/kg群で10例にみられた。また、300 mg/kg以上の群では有意差が認められ、用量相関性も確認された。尿管の好塩基性変化は、雌では1000 mg/kg群で1例にみられた。その他には、対照群および1000 mg/kg群の雌雄とも心臓、脾臓および副腎に異常はみられなかった。

回復期間終了時には、肝臓において門脈周囲の肝細胞の空胞変性が雄では対照群で1例、1000 mg/kg群で3例にみられた。この変化は、雌では対照群で4例、1000 mg/kg群で2例にみられた。なお、その他に、巣状壊死



が1000 mg/kg群の雄で1例にみられたのみであった。腎臓において、尿細管の硝子滴変性が対照群の雄で2例にみられた。尿細管の好塩基性変化は、1000 mg/kg群の雄で1例にみられた。

### 考察

1,2,4-トリメチルベンゼンを雌雄ラットに30, 100, 300および1000 mg/kgの投与量で1日1回、28日間反復経口投与し、その毒性について検討した。一部の動物については、14日間の回復期間を設けた。

死亡は、いずれの群にも発現しなかった。一般状態では、雌雄とも300 mg/kg以上の投与で投与直後に流涎がみられた。この流涎は、高濃度の検体投与でより顕著に認められていることから、1,2,4-トリメチルベンゼンの刺激により生じた可能性が考えられる。

体重は、雌雄とも1000 mg/kgの投与で増加抑制がみられ、この変化は回復期間中も継続して認められた。しかし、1000 mg/kgの投与でも摂餌量に影響はみられなかった。摂水量は、雄では300 mg/kg以上の投与で、雌では1000 mg/kgの投与で増加がみられ、この変化は回復期間中も継続して認められた。

尿検査では、雌雄とも1000 mg/kgの投与で摂水量の増加に伴う尿量の高値がみられたが、これらの変化は回復期間終了前には消失した。

血液学検査では、投与期間終了時に1000 mg/kg群の雄でヘモグロビン量の高値、雌で血小板数の低値、回復期間終了時には1000 mg/kg群の雌で活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮がみられた。しかし、これらの変化は、いずれも軽微なものであり、生理的変動の範囲内の変化であると考えられる。したがって、1,2,4-トリメチルベンゼンの1000 mg/kgを投与しても、血液学的検査の各項目に影響は及ぼさないと判断した。

血液生化学検査において、雄では投与期間終了時に300 mg/kg以上の群でアルブミン率、A/G比およびKの高値、 $\alpha_1$ -グロブリン率の低値、1000 mg/kg群で総ビリルビンおよびNaの有意な低値がみられた。雌では、投与期間終了時に300 mg/kg以上の群で総コレステロールの高値、1000 mg/kg群でGPTおよび $\alpha_2$ -グロブリン率の高値、 $\alpha_1$ -グロブリン率、 $\alpha_3$ -グロブリン率および総ビリルビンの低値がみられた。しかし、これらの変化はいずれも軽微であり、当社のほぼ同週齢ラットの集積データの範囲内の数値であることから、毒性学的意義はないと判断した。

剖検では、雌雄とも1000 mg/kgを投与しても1,2,4-トリメチルベンゼンによる影響はみられなかった。

器官重量については、雄では300 mg/kg以上の群で腎臓の相対重量の高値、1000 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値と絶対重量の高値傾向、腎臓の絶対重量の高値がみられた。雌では、300 mg/kg以上の群で肝臓の絶対・相対重量の高値、1000 mg/kg群で腎臓の相対重量の高値と絶対重量の高値傾向がみられた。なお、類似化学物質である1,4-ジエチルベンゼンの反復投与においても、

肝臓および腎臓重量の増加が報告されている<sup>6)</sup>。したがって、1,2,4-トリメチルベンゼン投与により肝臓および腎臓重量に影響が生じると考えられる。なお、雌雄で認められたこれら器官の重量増加は回復期間終了時には消失した。

病理組織学的検査では、投与期間終了時に雄で腎臓に尿細管の硝子滴変性がみられた。この変化は、ラットの雄でしばしば観察される変化であるが、本試験では軽度以上の変化の出現例数が300 mg/kg以上の群で増加し、程度も増強されていることから、変化を増強する何らかの影響を受けたものと考えられる。しかし、この変化は可逆性のものであった。

肝臓では、投与期間終了時に雌雄で門脈周囲の肝細胞の空胞変性がみられ、特に対照群および30 mg/kg群で多く観察された。この変化は、コーンオイルを反復投与した場合によくみられている所見であり、100 mg/kg以上の群の雄と1000 mg/kg群の雌で軽微であった機序は不明であるが、毒性学的には問題のない変化と考えられる。なお、病理組織学的検査において、肝臓重量の増加と関連した所見が得られなかったこと、ならびに類似化学物質での結果から、重量増加は薬物代謝亢進に適応した変化と考えられる。

以上のことから、1,2,4-トリメチルベンゼンは肝臓および腎臓に影響を及ぼすことが示唆された。なお、雄では300 mg/kg以上の投与で流涎、摂水量の増加、腎臓重量の増加および腎臓に尿細管の硝子滴変性、1000 mg/kgの投与で体重増加の抑制、尿量の増加および肝臓重量の増加、雌では300 mg/kg以上の投与で流涎および肝臓重量の増加、1000 mg/kgの投与で体重増加の抑制、摂水量の増加、尿量の増加および腎臓重量の増加がみられたことから、当試験条件下における1,2,4-トリメチルベンゼンの28日間反復経口投与による毒性学的無影響量は雌雄とも100 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 丸善石油(株)社内資料
- 2) 佐久間昭, “薬効評価—計画と解析 I, II,” 東大出版会, 東京, 1977, 1981.
- 3) C. W. Dunnett, *Biometrics*, **20**, 482(1964).
- 4) H. Scheffé, *Biometrika*, **40**, 87(1953).
- 5) W. H. Kruskal, W. A. Wallis, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **47**, 583(1952).
- 6) 萩田孝一ら, 化学物質毒性試験報告, **2**, 37(1995).

連絡先

試験責任者: 古橋忠和  
試験担当者: 長瀬孝彦, 藤村高志, 虫賀勇樹,  
外山勝己, 牧野浩平, 木村 均  
(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所  
〒501-62 岐阜県羽島市福寿町間島6-104  
Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)  
Takahiko Nagase, Takashi Fujimura,  
Yuuki Mushiga, Katsumi Toyama,  
Kohei Makino and Hitoshi Kimura  
Nihon Bioresearch Inc. Hashima Laboratory  
6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-  
62, Japan  
Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284