

Table 2: MXDA Mitotic Index

Test substance concentration (ug/ml)	Number of metaphases per 1000 cells	
	Absolute	% of control
<i>First fixation time:</i>		
-S9		
Control	105-79	100
75	85-60	79
200	80-57	74
325	81-55	74
450	63-53	63
+S9		
Control	42-55	100
200	45-89	138
400	91-75	171
600	8-17	26
800	2-29	32
<i>Second fixation time:</i>		
-S9		
Control	91-102	100
75	97-119	112
200	99-90	98
325	78-64	74
450	50-69	62
EMS (8 mM)	40-27	34
+S9		
Control	81-102	100
200	63-74	75
400	68-61	70
600	55-38	50
800	0-0	0
CP (5 ug/L)	24-25	27
<i>Third fixation time:</i>		
-S9		
Control	110-115	100
75	116-117	104
200	125-104	102
325	107-135	108
450	107-111	97
+S9		
Control	120-108	100
200	98-96	85
400	91-91	79
600	29-28	25
800	94-98	84

Test substance : PURITY: 99.6% (+ 0.2% paraxylenediamine)
ANY OTHER INFORMATION:

Lot No.: 26589/AMZ

Keep under nitrogen in the dark

Conclusion : The number of cells with chromosome aberrations found in the solvent control cultures fell within the laboratory historical control data range. The positive control chemicals both produced statistically significant increases in the number of cells with aberrations. It was therefore concluded that the test

conditions were optimal and that the metabolic activation system functioned properly.

The test with CHO cells should therefore be considered valid and that the test substance is not clastogenic under the conditions of the test.

Reliability : (1) valid without restriction
Guideline study
Flag : Critical study for SIDS endpoint
25.06.2001

(11)

5.6 GENETIC TOXICITY 'IN VIVO'

Type : Micronucleus assay
Species : mouse
Sex : male/female
Strain : Swiss
Route of admin. : other: oral intubation
Exposure period : Single dose
Doses : 750 mg/kg Bodyweight
(Dose volume = 10 ml/kg bodyweight)
Result : negative
Method : Directive 84/449/EEC, B.12 "Other effects - Mutagenicity (micronucleus test)"
Year : 1989
GLP : yes
Test substance : as prescribed by 1.1 - 1.4
Method : METHOD FOLLOWED:
Study conducted in accordance with generally accepted scientific principles.
Guideline based on:
Method B12, 67/548/EEC (September 19, 1984)
OECD Guideline No. 474 (Adopted May 26, 1983)
EPA Test Guideline (TSCA, FIFRA), Subchapter R, part 798, subpart F,
Genetic Toxicity § 798.5395 (revised July 1, 1986).

DEVIATIONS FROM GUIDELINE:
Feed was withheld overnight prior to dosing until approximately 8-9 hours
after administration of the test substance instead of 3-4 hours.
STATISTICAL METHOD:
Wilcoxon Rank Sum test, two-sided test at $P < 0.05$
Test condition : TEST ORGANISMS:
Age: 8 weeks at start of treatment.
Weight at study initiation: Males: 26- 34g, Females: 20 - 26g
Number of animals: 5 male and 5 female animals were dosed with 750
mg/kg bodyweight
ADMINISTRATION/EXPOSURE:
Vehicle: Milli-RO water
Duration of test/exposure: Animals were sacrificed at 24, 48 and 72 hours
after dosing. (At 48 hours for the positive control).
Frequency of treatment: Single dose.
Control groups and treatment:
Negative control: vehicle only
Positive control: Cyclophosphamide (50 mg/kg bodyweight dissolved in
0.9% NaCl in Milli-RO water.
Route and frequency of administration were consistent with those of the test
substance.
EXAMINATIONS:

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 6-tert-Butyl-2,4-xyleneol in Rats

要約

既存化学物質の安全性を評価するため、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールを雌雄のCrj:CD (SD) 系ラットに単回経口投与し、急性毒性を検討した。なお、投与量は雄で819, 1024, 1280, 1600および2000 mg/kgの5用量とし、雌で655, 819, 1024, 1280および1600 mg/kgの5用量とした。

死亡例は、雄では1024 mg/kg、雌では819 mg/kg以上の群で認められ、雄では2000 mg/kg群、雌では1280 mg/kg以上の群で全例が死亡した。LD₅₀値は雄で910 mg/kg (95%信頼限界570~1452 mg/kg)、雌で972 mg/kg (95%信頼限界814~1162 mg/kg)であった。一般状態の変化としては、多数例に自発運動低下および腹臥位が観察され、さらに死亡例では側臥位、体温低下および褐色尿が観察された。また、生存した一部の例には、歩行異常が観察された。生存例の体重は、雌雄ともに観察期間終了時まで順調に増加した。病理学検査のうち肉眼的観察所見では、死亡例において胸水の貯留、胸腺の黒色斑点、膀胱の黒色斑点、褐色尿の貯留、前胃の白色斑点、腺胃の黒色斑点、小腸の白色、褐色あるいは黒色内容物、小腸の白色斑点および大腸の白色内容物が認められた。また、観察期間終了時の生存動物では肝臓の黄色斑点、肝臓と脾臓、横隔膜あるいは後腹膜の癒着、脾臓の萎縮、脾臓と腎臓の癒着、前胃の肥厚および前胃と肝臓あるいは横隔膜の癒着が認められた。病理組織学検査では、観察期間終了時の雄の生存例において、前胃に高度の潰瘍および肉芽腫性炎あるいは扁平上皮細胞の増生および肉芽腫性炎がみられ、肝臓に肉芽腫性炎が認められた。

方法

1. 被験物質

6-tert-ブチル-2,4-キシレノール (CAS No.1879-09-0, 東京化成工業(株), Lot.No. FGC01, 純度98.5%, 分子量178.30, 凝固点21.5 °C)はごく薄い黄色を呈した透明の液体であり、使用時まで室温条件下で密閉遮光保管した。

2. 供試動物

生後5週のCrj:CD (SD) 系ラット (SPF) 雌雄各30匹を日本チャールス・リバー(株)から購入した。8日間にわたり動物を検疫・馴化飼育した後、6週齢で試験に用いた。投与

時の体重は、雄で145~164 g、雌で116~145 gであった。

3. 飼育

動物は、温度23±2 °C、湿度55±10%、換気回数20回/時間、照度150~300 lux、照明時間12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)に設定された飼育室で、(株)東京技研サービスの自動水洗式飼育機を使用し、ステンレス製網目飼育ケージに5匹ずつ収容して飼育した。飼育ケージおよび給餌器は週1回取り換えた。動物には、オリエンタル酵母工業(株)製造の固型飼料MFを自由に摂取させ、飲料水としては、水道水を自由に摂取させた。

4. 用量設定理由

本試験に先立ち、500, 1000および2000 mg/kgの用量を雌雄各3匹のラットに投与した予備試験の結果、雌雄ともに500 mg/kg群では死亡例が認められなかったが、1000 mg/kg群で各1例、2000 mg/kg群では全例が死亡した。この結果を参考にして、本試験では雄で819, 1024, 1280, 1600および2000 mg/kgの5用量を、雌で655, 819, 1024, 1280および1600 mg/kgの5用量を設定した。

5. 群分け

動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。

6. 投与液の調製および投与方法

所定量の被験物質をコーンオイル(ナカライテスク(株))に溶解した。溶液の濃度は、655, 819, 1024, 1280, 1600および2000 mg/kg群で、それぞれ13.1, 16.4, 20.5, 25.6, 32.0および40.0 w/v%であった。

投与経路は経口とし、16時間絶食させた動物に上述の被験物質溶液を注射ポンプおよび胃ゾンデを用い、投与した。投与容量は体重100 gあたり0.5 mlとし、個体別に測定した体重に基づいて算出した。給餌は被験物質投与3時間後に行った。

7. 一般状態の観察

中毒症状および生死の観察は、投与6時間までは1時間毎に、以後1日2回午前と午後(休日は午前のみ)14日間にわたって実施した。

8. 体重

体重は投与直前、投与7および14日に測定した。また、死亡例については死亡発見時に測定した。

9. 50%致死量(LD₅₀)の算出

Litchfield-Wilcoxon(1949)の方法により、投与14日の死亡率からLD₅₀値およびその95%信頼限界を算出した。

10. 病理学検査

観察期間中の死亡例については死亡発見時に、また生存例については観察期間終了時にエーテル麻酔後放血安楽死させ解剖した。肉眼的な異常の認められた器官、組織について記録するとともに、10%中性緩衝ホルマリン液に保存し、その一部を病理組織学検査に供した。

結果

1. 死亡率およびLD₅₀値

雄では1024 mg/kg、雌では819 mg/kg以上の群で死亡が認められ、雄では2000 mg/kg群、雌では1280 mg/kg以上の群で全例が死亡した。これらの死亡例は、雄で投与6時間から4日、雌で投与6時間から2日までに認められた。LD₅₀値は雄で910 mg/kg(95%信頼限界570~1452 mg/kg)、雌で972 mg/kg(95%信頼限界814~1162 mg/kg)であった。

2. 一般状態

全用量群の雌雄に共通して、自発運動低下および腹臥位が投与1ないし2時間から認められ、さらに生存例では一部の例に円背位が投与4時間以降にみられ、雄の1600 mg/kg以下、雌の1024 mg/kg以下の群では、投与6時間以降に歩行異常が観察された。

死亡例では、側臥位および体温低下が投与5時間以降に雄で1024 mg/kg以上、雌で819 mg/kg以上の群で観察さ

れ、さらに一部の例に円背位が投与4時間以降、褐色尿が投与2ないし3日に認められた。生存例の症状は、投与4から6日の間に回復した。

3. 体重

死亡例では、雌雄ともに投与直前の測定値と比較して死亡時の体重減少が認められた。一方、生存例では雌雄ともに投与7および14日の測定で順調な増加が認められた。

4. 病理学検査所見

死亡例の肉眼的観察所見では雌雄ともに胸腺の黒色斑点、褐色尿の貯留、小腸の黒色内容物および白色斑点が認められ、さらに雄で胸水の貯留、膀胱の黒色斑点、前胃の白色斑点、腺胃の黒色斑点、小腸および大腸の白色内容物が、雌で小腸の褐色内容物が認められた。一方、観察期間終了時の生存例では雌雄ともに前胃と横隔膜の癒着が認められ、さらに雄で肝臓の黄色斑点、前胃と肝臓の癒着、肝臓と横隔膜あるいは後腹膜の癒着、肝臓と脾臓の癒着、脾臓と腎臓の癒着および前胃の肥厚が、雌で脾臓の萎縮が認められた。また、病理組織学検査では、観察期間終了時の雄の生存例において、前胃に高度の潰瘍および肉芽腫性炎あるいは扁平上皮細胞の増生および肉芽腫性炎がみられ、肝臓に肉芽腫性炎が認められた。

考察

1群雌雄各5匹のCD(SD)系ラットを用いて、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの単回経口投与毒性試験を実施した。投与用量は、雄では819, 1024, 1280, 1600および2000 mg/kgの5用量とし、雌では655, 819, 1024, 1280および1600 mg/kgの5用量とした。

その結果、死亡例では前胃および小腸の白色斑点、腺胃の黒色斑点などが認められ、被験物質が消化器系粘膜

Table 1 Mortality and LD₅₀ values of rats treated orally with 6-tert-butyl-2,4-xyleneol

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Number of deaths ^{a)}								Mortality	LD ₅₀ values ^{b)} (mg/kg)	
			1	2	3	4	5	6	7	14			
Male	819	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	910 570-1452 ^{c)}
	1024	5	1	0	2	0	0	0	0	0	0	3/5	
	1280	5	0	1	2	0	0	0	0	0	0	3/5	
	1600	5	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4/5	
	2000	5	2	2	0	1	0	0	0	0	0	5/5	
Female	655	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	972 814-1162 ^{c)}
	819	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1/5	
	1024	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3/5	
	1280	5	1	4	0	0	0	0	0	0	0	5/5	
	1600	5	2	3	0	0	0	0	0	0	0	5/5	

a: Days after administration

b: LD₅₀ values estimated by Litchfield-Wilcoxon method

c: 95% confidence limits

に対して強い刺激性または腐食性の障害を与えたものと考えられた。また、生存例では、前胃が関与した腹腔内器官の癒着が認められたため、病理組織学検査を実施した結果、前胃に高度の潰瘍および肉芽腫性炎が認められた。これらの器官間の癒着は、被験物質投与によって前胃の漿膜面が炎症性変化を起こし、次いで壁側、腑側の向かい合う器官面と癒着したものと考えられた。

連絡先

試験責任者：大庭耕輔
試験担当者：藤島 敦
(財)食品農医薬品安全性評価センター
〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors : Kousuke Oba (Study director)
Atsushi Fujishima
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-Pyo Center)
582-2 Shioshinden Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun,
Shizuoka, 437-12, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 6-tert-Butyl-2,4-xyleneol by Oral Administration in Rats

要約

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールは化学産業の分野において合成樹脂や接着剤の原料として使用されている化合物である。本化合物の毒性については、経口投与によるマウスのLD₅₀が530 mg/kg¹⁾と報告されているが、ヒトや実験動物の生体に及ぼす影響についてはほとんど知られていない。一方、本化合物の類似物質である2,4-キシレノール(2,4-ジメチルフェノール)については、経口投与によるラットのLD₅₀が3,200 mg/kg、マウスのLD₅₀が809 mg/kgなどが報告されている²⁾。今回、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの毒性学的性質を評価するために反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行った。すなわち、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの0(溶媒対照)、6、30および150 mg/kg/dayをSprague-Dawley(Crj:CD(SD))ラットの雌雄に交配前2週間および交配期間2週間を通じて連日経口投与し、さらに雄では交配期間終了後17日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで連続投与し、親動物に対する反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 反復投与毒性

一般状態には被験物質投与の影響は認められなかったが、雌の150 mg/kg群で妊娠末期に2例の死亡(1例は分娩中に死亡)が観察された。雌の150 mg/kg群で妊娠期間中に体重増加抑制が認められたが、雄の体重および雌雄の摂餌量に被験物質投与の影響は認められなかった。雄の血液学検査では、150 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数が低値、網赤血球比率が高値を示し、軽度ながら貧血傾向が認められた。血液生化学検査では、30および150 mg/kg群でGOTの低値およびγ-GTPの高値が認められた。器官重量は雄の30 mg/kg以上の投与群および雌の150 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が増加または増加傾向を示し、剖検所見では雄の30および150 mg/kg群で肝臓の肥大が、雌の150 mg/kg群で肝臓および腎臓の肥大が認められた。病理組織学所見では、被験物質投与の影響と考えられる所見として、雄の150 mg/kg群で肝臓の小葉中心性肝細胞腫脹が、雌の150 mg/kg群で哺育4日剖検動物に肝臓の小葉中心性肝細胞腫脹、肝細胞変性、小葉中心性細胞壊死および単細胞壊死が、死亡例および全児死亡の認められた動物に舌および食道の錯角化症、肝臓の小葉中心部の肝細胞腫脹や壊死をはじめ種々の変性や単細胞壊死と細胞分裂の増加が認められた。また、雌の同群では、腎臓の近位尿細管の変

性や蛋白円柱および腎乳頭部のPAS陽性顆粒の沈着などが観察された。

2. 生殖発生毒性

交尾能、受胎能および性周期観察では、被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時観察では、150 mg/kg群で1例が分娩中に死亡した。また、同群で哺育期間中に全児死亡の認められた動物が3例観察され、新生児の哺育4日生存率が低値傾向を示し、分娩あるいは哺育機能の障害を惹起する可能性が示唆された。なお、妊娠期間および分娩時間に被験物質投与の影響は認められなかった。新生児の外表検査では、外表異常は観察されず、新生児の体重も哺育4日まで順調に増加した。死産児、死亡児および哺育4日の剖検でも被験物質投与によると考えられる異常所見は認められなかった。

以上の結果から、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの反復投与毒性は、雄では30 mg/kg/day以上、雌では150 mg/kg/dayの投与で認められ、無影響量は雄で6 mg/kg/day、雌で30 mg/kg/dayと推察される。また、雄の生殖に及ぼす影響は150 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量は150 mg/kg/dayと推察される。雌の生殖能および児動物の発生・発育に及ぼす影響は150 mg/kg/day投与で認められ、無影響量は30 mg/kg/dayと推察される。

方法

1. 被験物質

6-tert-ブチル-2,4-キシレノール(CAS No.1879-09-0, 東京化成工業(株), Lot.No. FGC01, 純度98.5%, 分子量178.30, 凝固点21.5°C)はごく薄い黄色を呈した透明の液体であり、使用時まで室温条件下で密封遮光保管した。

被験物質は、コーンオイル(ナカライテスク(株))に溶解し1.2、6および30 mg/mlの濃度になるよう各群の投与液を調製した。調整後は、使用時まで冷暗条件下で密閉保管した。1.2 mg/mlの場合、冷暗条件下で少なくとも8日間安定であることが確認されている。

投与液の濃度分析は調製開始時に調製した各群のバッチから無作為にサンプルを抽出し実施した。その結果、設定濃度の99.3~104%の範囲で調製されておりほぼ所定量の6-tert-ブチル-2,4-キシレノールが含有されていたことを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー(株)から購入した8週齢のSprague-Dawley(Crj:CD(SD),SPF)系雌雄ラットを使用した。購入した動物は、7日間検疫・馴化飼育した後、一般状態に異常が認められなかった動物を8日間の予備飼育後、10週齢で群分けして試験に用いた。群分け終了時の体重は、雄で339~400g、雌で226~265gであった。

動物は、温度22~26°C、湿度45~65%、換気回数15回/時間、照度150~300 lux、照明時間12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)に設定されたバリアシステムの飼育室で飼育した。アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに動物を1匹ずつ収容し飼育した。妊娠18日以降の母動物は哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに哺育トレーおよび巣作り材料(アルファードライ)を入れて飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)製造のNMF固型飼料(放射線滅菌飼料)を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水を自由に摂取させた。供給した飼料、水および巣作り材料には試験に支障を来す可能性の考えられる夾雑物の混在はなかった。

3. 群分け

雌雄とも投与開始日の体重をもとに層別化し、無作為抽出法により1群当たり12匹を振り分けた。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の用量は、先に実施した予備試験の結果を参考にして決定した。すなわち、0, 75, 150, 300 および 600 mg/kg を雄および雌に14日間連続投与した結果、600 mg/kg 群の雌雄で全例が死亡した。また、300 mg/kg 以上の投与群の雄および600 mg/kg 群の雌で体重増加抑制がみられ、150 mg/kg 以上の投与群の雄および300 mg/kg 以上の投与群の雌で摂餌量の低値がみられた。剖検時の器官重量は、75 mg/kg 以上の投与群の雄および150 mg/kg 以上の投与群の雌で肝臓の実重量および相対重量がともに高値を示した。剖検では、150 および 300 mg/kg 群の雄ならびに300 mg/kg 群の雌で肝臓の肥大がみられた。以上の結果を基に、本試験の投与期間が長期間になることを考慮し、高用量として150 mg/kg/day を設定し、以下公比5にて除し中用量を30 mg/kg/day および低用量を6 mg/kg/day にそれぞれ設定した。

投与経路は、OECDガイドラインに準じて強制経口投与とした。投与容量は、体重100g当たり0.5 mlとし、個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行い、胃ゾンデを用いて毎日1回強制経口投与した。対照群にはコーンオイルのみを同様に投与した。雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間の14日間を含めて交配期間終了後17日間の連続45日間とした。雌の投与期間は、交配前14日間と交配期間中(交尾成立まで最長14日間)および交尾成立後の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで(41~48日間)とした。なお、妊娠不成立の雌は妊娠25日の解剖前日までの44日間とした。

5. 観察および検査

1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

2) 体重

雄では、投与1(投与開始日)、8, 15, 22, 29, 36, 43および46日(剖検日)に測定し、投与1から43日までの体重増加量を算出した。雌では、投与1(投与開始日)、8, 15および22日に測定し、投与1から15日までの体重増加量を算出した。交尾の成立しなかった雌はそれ以後の投与29, 36, 43および46日に測定した。また、交尾が成立した雌は、妊娠0, 7, 14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に測定し、それぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの体重増加量を算出した。

3) 摂餌量

雄では、投与1(投与開始日)、8, 15, 22, 29, 36, 43および45日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与22から45日までの累積摂餌量を算出した。雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾成立の雌は妊娠0, 7, 14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともにそれぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかった。

4) 交配

交配前14日間の性周期観察を行った雌を同群内の雄のケージに入れ1対1で最長2週間毎晩同居させた。翌朝、腔垢中の精子確認をもって交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交配結果から、各群について交尾率[(交尾成立動物数/同居動物数)×100]および受胎率[(受胎動物数/交尾成立動物数)×100]を求めた。性周期の観察は交尾成立日までに行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数とし平均性周期を算出した。

5) 自然分娩時および新生児の観察

交尾成立動物は全例を自然分娩させた。分娩の確認は妊娠20日から25日の午前9時~10時に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体についてその日を哺育0日とした。午前10時以降に分娩したものは、翌日を哺育0日とした。分娩を確認した全例について妊娠期間(哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数)および出産率[(生児出産雌数/受胎雌数)×100]を求めた。

新生児は哺育0日に出生児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率[(総出産児数/着床数)×100]および出生率[(出生児数/総出産児数)×100]を求めた。生存児については性別を判定するとともに外表異常の有無を調べた。ま

た、哺育0および4日に雌雄別の同腹児重量を測定し、雌雄別1匹当たりの平均重量を算出した。哺育4日の新生児の同腹児重量を測定後に新生児全例をエーテル麻酔により屠殺し、主要器官の肉眼観察を行った。なお、哺育期間中の死亡児についても同様に主要器官の肉眼観察を行った。また、新生児の4日生存率[(哺育4日生児数/出生産生児数)×100]を求めた。

6) 臨床検査

各群の雄全例について剖検時に実施した。動物を最終投与日(投与期間:45日間)の夕方から翌朝まで約16時間絶食させた後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血した。

a) 血液学検査

検査はEDTA3-Kを添加した初血について、THMS H 6000(テクニコン社)を用いて白血球数(WBC:暗視野板法)、赤血球数(RBC:暗視野板法)、ヘマトクリット値(HCT:全赤血球の容積より補正)、ヘモグロビン量(HGB:シアンメトヘモグロビン法)、平均赤血球容積(MCV:RBC,HCTより算出)、平均赤血球色素量(MCH:HGB,RBCより算出)、平均赤血球色素濃度(MCHC:HGB,HCTより算出)、血小板数(PLT:暗視野板法)および白血球百分率(フローサイトケミストリー法)を測定した。網赤血球(RC)比率の算定については網赤血球染色用ガラス毛細管キャピロット(テルモ(株))で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

b) 血液生化学検査

検査はクリーンシール((株)ヤトロン)に血液を採取し、30分間放置後3,000 r.p.m. 7分間遠心分離して得た血清について、多項目生化学自動分析装置CentrifiChem ENCORE II(ペーカー社)およびEKTACHEM 700N(コダック社)を用いて総蛋白(ビュレット法)、アルブミン(B.C.G.法)、A/G(計算値)、血糖(グルコースオキシダーゼ法)、尿素窒素(ウレアーゼ改良法)、クレアチニン(Jaffé法)、総ビリルビン(ジアゾ色素法)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(Karmen改良法)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(Karmen改良法)、 γ -グルタミルトランスベプチダーゼ(Szasz改良法)、カリウム(電極法)、塩素(電極法)、カルシウム(アルセナゾIII色素法)および無機リン(モリブデン酸アンモニウム法)を測定した。

6. 病理学検査

1) 剖検および器官重量

a) 死亡例

発見後直ちに剖検した。皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、陰、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

b) 雄動物

45日間投与した日の夕方から餌を除き、約16時間の絶食させた翌日にエーテル麻酔下で安楽死させた。剖検では主要器官の肉眼的観察を行い、胸腺、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比(相対重量)を求めた。また、全動物の重量測定器官に加えて脳、心臓、脾臓、副腎、精囊、前立腺、下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として肺および腹腔内の塊を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、精巣および精巣上体はブアン氏液で固定した。

c) 自然分娩した雌

哺育4日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。剖検では主要器官の肉眼的観察を行った後、胸腺、肝臓、腎臓および卵巣重量を測定し器官重量・体重比(相対重量)を求めた。また、全動物の重量測定器官に加えて脳、心臓、脾臓、副腎、下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として腹腔内の塊を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。剖検時に黄体数および着床数を調べ、着床率[(着床数/妊娠黄体数)×100]求めた。

d) 自然分娩の認められない雌

妊娠25日に、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。剖検では主要器官の肉眼的観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、陰、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。着床痕が認められない動物は妊娠不成立と判定した。

e) 全児死亡の認められた雌

生存児すべての死亡または喰殺が確認された日またはその翌日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。剖検では主要器官の肉眼的観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、陰、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。剖検時に黄体数および着床数を調べ、着床率[(着床数/妊娠黄体数)×100]求めた。

2) 病理組織学検査

a) 死亡例

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、陰、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄について実施した。

a) 妊娠を成立させた雄

対照群と高用量群の全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣およびすべての群の異常病変部組織。6および30 mg/kg群の全例の胸腺、肝臓、腎臓および副腎についても組織学検査を実施した。

b) 自然分娩した雌

対照群と高用量群の全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣およびすべての群の異常病変部組織。6および30 mg/kg群の全例の胸腺、肝臓、腎臓および副腎についても組織学検査を実施した。

c) 妊娠を成立させなかった雄および妊娠不成立の雌

全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、陰、子宮、卵巣、精巣、精巣上体、精囊、前立腺および下垂体について実施した。

d) 全児死亡の認められた雌

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、陰、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄について実施した。

7. 統計解析

体重、摂餌量、黄体数、着床痕数、出産児数、性比、平均性周期、妊娠期間、着床率、分娩率、出生率、外形異常発現率、新生児の4日生存率、器官重量、器官重量・体重比(相対重量)、血液学および血液生化学検査値についてはまずBartlettの等分散検定⁹⁾を実施した。等分散の場合は一元配置分散分析を行った。分散が有意で各群の標本数が同数の場合はDunnnettの多重比較検定、各群の標本数が異なる場合はSchefféの多重比較検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。Bartlettの等分散検定で不等分散の場合はKruskal-Wallisの順位検定を実施した。有意で各群の標本数が同数の場合はDunnnettの順位検定、各群の標本数が異なる場合はSchefféの順位検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。出産率、交尾率および受胎率については χ^2 検定^{5,6)}を用いた。病理学検査の異常所見頻度についてはFisherの直接確率検定法⁶⁾を用いた。なお、哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は* : $P < 0.05$ および** : $P < 0.01$ の2段階とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

死亡が雌の150 mg/kg群で妊娠23日に2例観察された。このうち1例は前日(妊娠22日)に自発運動低下が観察され、翌日死亡していた。他の1例は分娩中に死亡した。その他の投与群および雄では投与期間を通じ死亡例は観察

されなかった。雄の一般状態の観察では、脱毛(前肢)が6 mg/kg群で1例、眼分泌物が30 mg/kg群で2例、泌尿生殖器出血が150 mg/kg群で1例、歯異常(上顎切歯折れ)が対照群、30および150 mg/kg群でそれぞれ1, 2および1例に観察された。雌では、眼分泌物が30 mg/kg群で1例、脱毛(前肢、後肢、頸部)が対照群および6 mg/kg群で1および2例に観察された。

2) 体重 (Fig.1,2)

雄では、投与期間を通じ対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。雌の150 mg/kg群で対照群に比べ妊娠0から21日の間の体重増加量が低値を示した。6および30 mg/kg群では対照群との間に差は認められなかった。

3) 摂餌量 (Fig.3,4)

雄では、対照群に比べ150 mg/kg群で投与29から36日の平均1日摂餌量が高値を示したが、累積摂餌量には群間差は認められなかった。6および30 mg/kg群では対照群との間に差は認められなかった。雌では、投与期間を通じ対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

4) 血液学検査 (Table 1)

対照群に比べ150 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数が低値、網赤血球比率が高値を示した。6 mg/kg群で網赤血球比率が高値を示した。また、150 mg/kg群でリンパ球比率が低値、好中球比率が高値を示したが、軽微な変化であった。その他、6 mg/kg群で赤血球数が、30 mg/kg群で白血球数がいずれも高値を示したが用量に関連した変化ではなかった。

5) 血液化学検査 (Table 2)

すべての被験物質投与群で対照群に比べ塩素が高値、カルシウムが低値を示した。また、30および150 mg/kg群で対照群に比べ総蛋白、アルブミンおよび γ -GTP活性が高値、GOTが低値を示し、さらに150 mg/kg群でカリウムが低値を示した。その他、30 mg/kg群で無機リンが高値を示したが用量に関連した変化ではなかった。

6) 器官重量 (Table 3,4)

雄では、対照群に比べ30 mg/kg群で肝臓の相対重量が高値を示し、150 mg/kg群で肝臓、腎臓の実重量および相対重量がともに高値を示した。6 mg/kg群では対照群との間に差は認められなかった。雌では、150 mg/kg群で対照群に比べ肝臓および腎臓の相対重量が高値を示し、実重量も高値傾向を示した。6および30 mg/kg群では、対照群との間に差は認められなかった。

7) 剖検所見

死亡例は、雌の150 mg/kg群で2例認められた。肝臓の肥大が2例、肺の赤色化、小腸の黄色化、肝臓の白色斑/区域、腎臓および副腎の肥大が各1例に観察された。妊娠を成立させた雄では、被験物質投与群に多く観察さ

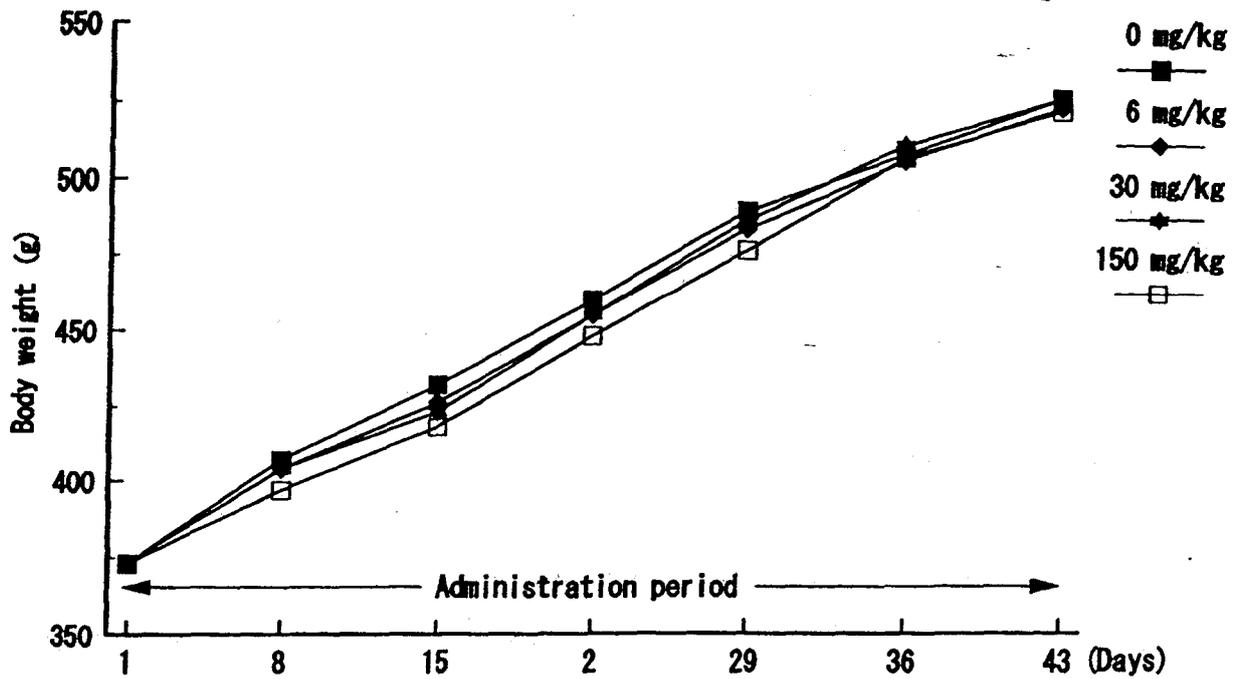


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with 6-*tert*-butyl-2,4-xyleneol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

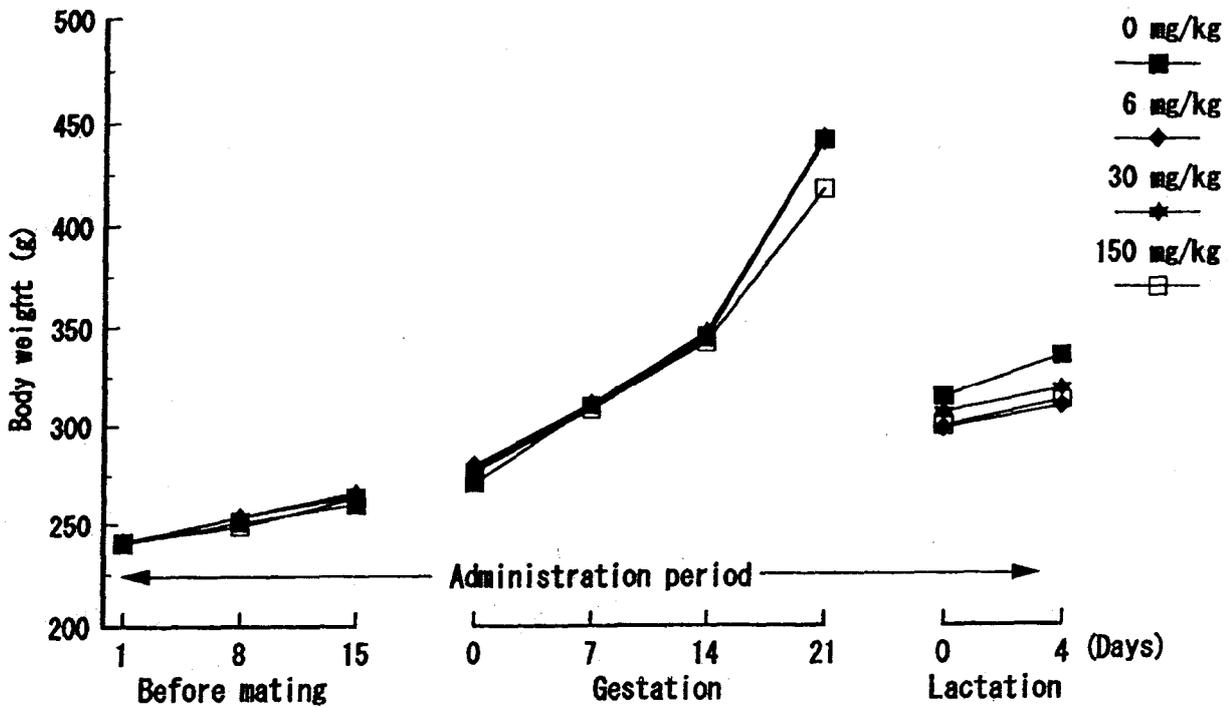


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with 6-*tert*-butyl-2,4-xyleneol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

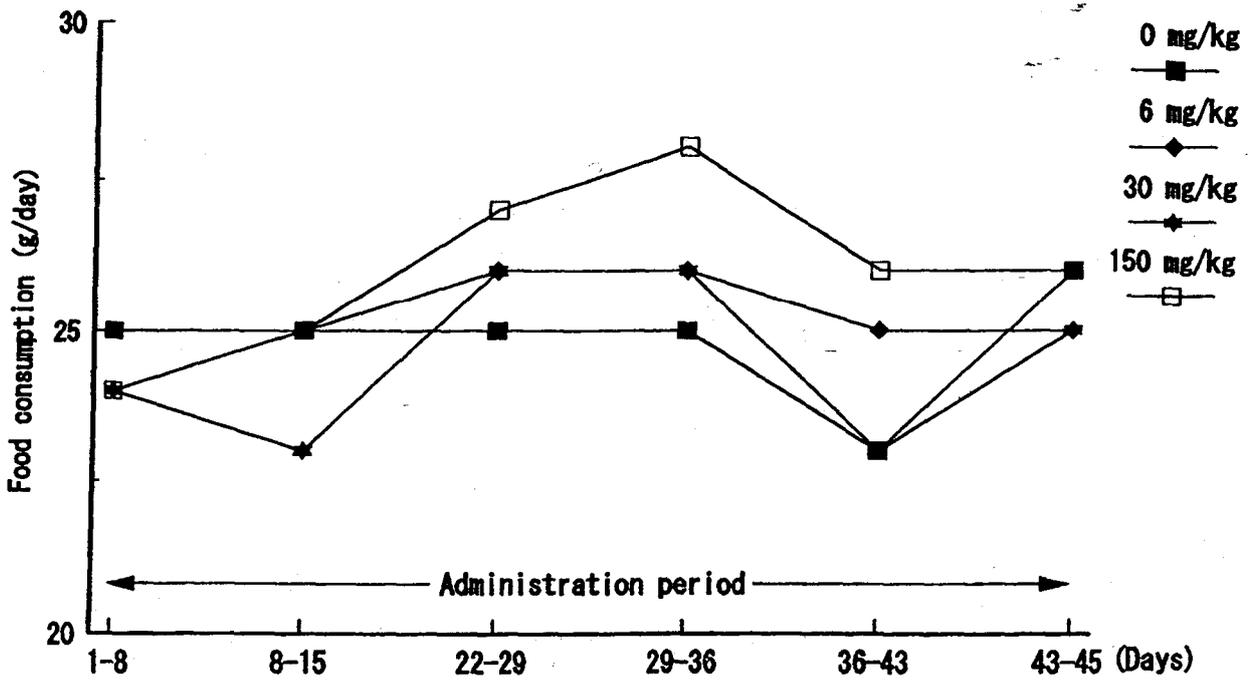


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 6-*tert*-butyl-2,4-xyleneol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

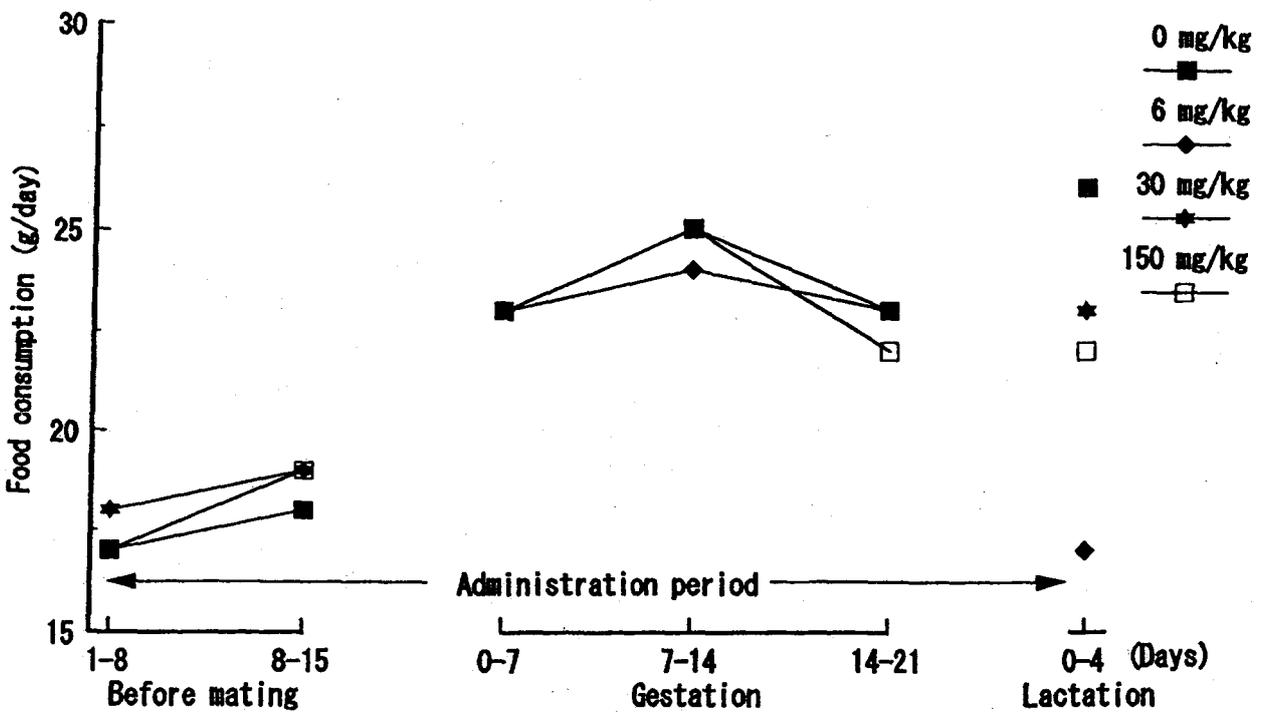


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 6-*tert*-butyl-2,4-xyleneol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test